

平成19年度厚生労働省科学研究費補助金新興・再興感染症研究事業
「広域における食品由来感染症を迅速に探知するために必要な情報に関する研究」班

分担研究報告

分担研究: ノロウイルス抗原のイムノクロマトグラフィーによる迅速検出方法

分担研究者	田中 智之	堺市衛生研究所
研究協力者	三好龍也、内野清子、吉田永祥	堺市衛生研究所
	武田直和	国立感染症研究所ウイルスⅡ部

研究要旨

食中毒の重要な原因ウイルスであるノロウイルス(Norovirus)の検査方法には、電子顕微鏡による検鏡、RT-PCR法によるウイルス遺伝子の検出、平成13年度厚生労働省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・予防に関する研究」(武田直和主任研究員)の研究成果として開発されたノロウイルス抗原検出ELISA法がある。このELISA法は、2005年11月に厚生労働省からノロウイルス感染症の体外診断用医薬品として承認された。本研究ではELISA法よりさらに簡便かつ迅速なイムノクロマトグラフ(Immunochromatography, IC)法の開発を試みた。開発されたIC法は、RT-PCR法をGolden standard methodとした場合、一致率は89.2%、感度81.0%、特異性100%である。測定時間は15分、検体搬入から約30分で診断できる。ベッドサイドでの診断が可能となり、さらに調理従事者のノロウイルス保有状況の把握と共に食材汚染防止による事前型食中毒予防が可能となった。

A: 研究目的

カキなどの食品中に含まれている、あるいは人為的な食材汚染となるノロウイルスは食中毒の原因ウイルスである一方、感染者(患者)などとの濃厚接触や患者吐物中のウイルスの付着した塵埃などを介して発生する施設内、院内の急性胃腸炎感染の集団感染の原因ウイルスでもある。

汚染食材による食中毒事例では、ノロウイルスが蓄積したカキを生食することによって生じる事例がこれまで約40%を占めていた。しかし、最近ではこの頻度はきわめて低くなり、2006年厚生労働省科学研究費補助金「ウイルス性食中毒の予防に関する研究」(武田直和主任研究員)報告では、カキに起因する食中毒事例は僅かに1.2%に過ぎず、その代わり、不顕性感

染者の調理従事者や感染後のウイルス保有調理従事者による食材汚染が原因となった食中毒事例の頻度が高くなっていた。

厚生労働省の食中毒事例報告でも、ノロウイルスが食中毒原因として占める率は 30~40%である。しかし、一事例の患者発生数は細菌に比べて極めて多く、例えば、平成 17 年、18 年を検証しても、一事例での患者比率は、細菌由来がそれぞれ 15.7, 12.5 人に対しノロウイルスは 31.9, 55.2 人と 2 倍~4 倍高くなっている。ノロウイルスは感染力がいかに強く、伝播力の強いウイルスであることがわかる。集団感染症の場合となる、病院、老人ホーム、心身障害児施設、幼稚園・学校などの閉鎖施設でのノロウイルスによる感染事例では、感染拡大防止が公衆衛生上、また、社会医学的にも極めて重要で、拡大防止の機を逸することによる病状の重症化の報告も多数見られる。

食品由来の感染症発生の予防対策には、食材そのものの汚染を早期に感知する方法と、調理従事者の感染の有無やウイルスの保有状況を迅速に診断し食品汚染を防止する方法がある。

今回、感染患者や健康保菌者からノロウイルスの迅速な診断を行い、二次感染防止策の構築を目的としたノロウイルス IC 診断法の開発を試みた。

B: 材料と方法

1) IC キットの構築と測定手順

ノロウイルス遺伝子型を広範囲

に認識するモノクローナル抗体、#NV3912 を含む 3 種類の抗体を用いた。モノクローナル抗体の作製には、バキュロウイルス発現によって作製されたウイルス様粒子 (virus-like particles, VLPs) を免疫原としてマウスに経口投与あるいは腹腔内投与し、定法どおり細胞融合を行った。これらのモノクローナル抗体の反応性の解析や VLPs 表面エピトープと反応性については既に報告している。

IC キットのテストストリップには、抗ノロウイルス抗体及びコントロールとして抗マウスグロブリン抗体が固相化されている。検体浮遊液を用いて 10% 糞便乳剤を作製した。2,000 xg, 5 分間遠沈後、上清 300 ul を検体浮遊チューブに移し、ラテックス標識抗ノロウイルス抗体と反応させた。その後このチューブに、上述のテストストリップを挿入し吸収・反応させた。検体にノロウイルス抗原が含まれていればノロウイルス・ラテックス標識抗体複合物がストリップ上の固相抗体と反応し、さらに未反応のラテックス標識モノクローナル抗体が固相化されている抗マウスグロブリンとも反応し、二本のラインが形成される。ノロウイルス抗原が含まれていなければコントロールのバンドのみが目視される。反応時間は 15 分であるが、検体の前処理等に要する時間を考慮しても約 30 分後には判定・診断される。

2) 材料

急性胃腸炎症状を呈した患児の便検体 102 検体を採取し、IC キット構築後の評価のための検体として用いた。一方、老健施設における嘔吐症患者の原因究明のため、迅速結果が求められた吐物および糞便各 1 検体、さらに、施設内食中毒事例において得られた糞便 18 検体が、検査現場での実際的な評価検体として用いられた。

評価対照の検査には RT-PCR 法が用いられた。

C: 結果

バキュロウイルスで発現されたノロウイルス様粒子(VLPs)を用いた IC キットの反応性は、GI グループで 6 遺伝子型(GI/1, GI/2, GI/3, GI/4, GI/6, GI/11)、GII グループで 13 遺伝子型(GII/1, GII/2, GII/3, GII/4, GII/5, GII/6, GII/7, GII/8, GII/12, GII/13, GII/14, GII/15, GII/17)と良好な反応性を示した。VLPs を用いた検出感度は、GI では 6.25~25.00 ng/ml, GII では 0.78~12.5 ng/ml である。リアルタイム PCR 法と比較すると、 $10^4 \sim 10^5$ copy/g stool のウイルス量が検出できる。

小児科外来で採取された急性胃腸炎患者検体 102 検体のノロウイルス抗原検出結果を表 1 に示した。RT-PCR 法との一致率は 89.2%, 感度 81.0%, 特異性 100% でであった。これらの小児はノロウイルスによる急性胃腸炎と診断された。

一方、迅速な結果が求められた老健施設の検体では、吐物、糞便ともに陽性であった。ノロウイルスによる感染

性胃腸炎と診断され、直ちに感染拡大対策が取られた。食中毒事例 18 検体では、陽性 7 検体、陰性 9 検体であった。これらすべての 20 検体は、後に行なわれた RT-PCR 法との比較から一致率 90%, 感度 81.2%, 特異性 100% であった(表 2)。また、検査のできたノロウイルス遺伝子型は GI/1 が 1 株、GI/4 が 1 株、GII/4 が 6 株で、そのうち 1 株は GI/1, GII/4 の混合感染であった。

D: 考察

ノロウイルスによる汚染食材、あるいは無症候性や病後調理従事者による食材汚染を介した食中毒は、全食中毒事例の約半数を占めている。さらに、ノロウイルスは幼稚園・保育園・学校などの共有施設、老人健康保健施設や心身障害児などの入所施設、あるいは病院内などでの集団感染性胃腸炎の原因ウイルスである。多数の感染者が出るのが特徴であり、とくに施設内感染は、患者・職員の交差感染に加えて、時には病棟などの施設閉鎖に至る場合がある。いずれの場合においても、感染終息までに要した経費は二次感染が生じれば生じるほど莫大となる。

したがって、感染が拡大する前の原因微生物の迅速な診断は、施設内感染拡大防止、不要な医療費削減に極めて大切な因子といえる。

ノロウイルス診断系の標準的な方法はないが、RT-PCR 法によるウイルス遺伝子検出が頻用されている。感度、特異性とも優れた方法であるが、多検

体処理能力、少なくとも半日以上要する検出時間、検査中の交差汚染、検査に係わる費用など、多くの即応できない要素も含まれている。これらを解消するために作製されたノロウイルス抗原検出 ELISA 法は、操作性の簡便性、経済性、多検体処理能力などの長所を有しているが、RT-PCR 法の感度に達していない。

今回、開発した IC 法は RT-PCR 法との一致率は 89.2%、感度は 80.0%、特異性は 100%であった。高い感度、特異性に加えて、操作性が簡便であること、低コストであり、前処理に約 15 分、反応に要する時間 15 分は最大のメリットと考えられる。

感染性胃腸炎の集団発生時や食中毒発生時には、従来の方法では対応できない迅速な診断が可能であり、その結果により患者の隔離などの院内感染拡大防止にも大きな貢献が出来る。事実、今回の迅速な結果が求められた施設内感染や食中毒事例でも、結果が迅速に判明したことから速やかに感染拡大防止がなされた。

さらに IC 法には、検出するウイルス量から判断しても、食品調理従事者の定期的検便に活用でき、事前に感染源対策、食材汚染対策も可能と考えられる。

ノロウイルスは遺伝子学的には遺伝子グループ(Genogroup)と遺伝子型(Genotype)に分けられる。Genogroupには I、II(G I、G II)が存在し、それぞれには 15 および 18 の遺伝子型が存在する(G I /1-15, G II /1-18)。昨シ-

ズンのノロウイルス流行の主流株は GII/4 であった。しかし、今後はどのような遺伝子型が主流株となるかは予測が出来ない。したがって、今回の IC 法は現時点で、GI グループで 6、GII グループで 13 の遺伝子型と反応することか確認されており、今後の流行に対しても大部分の遺伝子型を網羅して検出することが出来る。

IC 法は 2007 年 11 月 30 日に厚生労働省よりノロウイルス体外診断用医薬品として認可された。つまり、食中毒疑いの事例においても、感染性胃腸炎事例においても、IC 法が陽性であればノロウイルス感染と診断でき、且つ感染拡大予防に集中できると言える。加えて、原因微生物の迅速な同定のみならず、患者の的確な治療、不必要な検査などが著しく改善され、それに付随する経済的効果も飛躍的に伸びるものと期待される。

E: 結論

迅速、低価格、多検体処理能力を有するノロウイルス抗原診断迅速イムノクロマトグラフ法の開発を行なった。RT-PCR 法に比較すると、一致率 89.3%、感度 81.1%、特異性 100%の成績であった。この IC 法は、感染性胃腸炎・食中毒事例の迅速な診断による感染拡大対策のスムーズな構築のみならず、低価格、簡便な使用方法から、食品調理従事者の定期的な検便においてもノロウイルス保有状況のチェックが可能となり、ノロウイルス感染事前対応が可能となった。

F: 健康危機情報

なし

G: 研究発表

1) 論文発表

田中智之、武田直和

ノロウイルスの現状と院内感染対策。感染症 37(3): 94-104, 2007

田中智之、奥田真珠美

ウイルス性胃腸炎診断法の進歩と院内感染予防対策。

小児科診療 70(6): 985-990, 2007

田中智之、三好龍也、内野清子、武田直和

院内発生時における感染拡大防止対策 —ノロウイルス

月刊薬事 49(11): 37-42, 2007

田中智之、三好龍也、内野清子、武田直和

調理従事者を介して起こるノロウイルス食中毒

食と健康 10: 6-14, 2007

田中智之、加藤大介、鎌田公仁夫、三好龍也、内野清子、吉田永祥、田尻 仁、奥田真珠美、中山佳子、平山吉郎、北元憲利、武田直和

ノロウイルス迅速抗原検査

検査と技術 36(3): 235-239, 2007

2) 学会発表

福田伸治、三好龍也、内野清子、中村 武、吉田永祥、田中智之

市販ノロウイルス検査キットの評価

28 回衛生微生物技術協議会第研究

岡山市 2007年7月

田中智之

ノロウイルス食中毒と二次感染

第28回日本食品微生物学会学術総会 ランチオンセミナー

2007年9月 東京都

田中智之、田尻 仁

ノロウイルス迅速検査キットの開発 第56回日本感染症学会東日本地方会 東京都 2007年10月

中村 武、三好龍也、内野清子、福田伸治、田中智之

市販ノロウイルス検査キットの評価 第55回日本ウイルス学会学術集会 札幌市 2007年10月

北元憲利、三好龍也、内野清子、Grant S.Hansman、武田直和、田中智之

サポウイルスに対する単クローン抗体の樹立とその交叉性

第55回日本ウイルス学会学術集会 札幌市 2007年10月

太田真紀子、中長摩利子、木村定美、最上友紀子、鈴木保宏、中山雅弘、田中智之、位田 忍

ノロウイルス腸炎に関連した Rey 症候群を発症した乳児クローン病の一例

第34回日本小児栄養消化器肝臓学会 仙台市 2007年10月

H: 知的財産権の出願・登録状況

申請中

[表 1] 小児急性胃腸炎症例

		RT-PCR法		合 計
		+	-	
IC kit 法	+	47	0	47
	-	11	44	55
合 計		58	44	102

RT-PCR 法との一致率：89.2%

感 度：81.0%

特異性：100%

[表 2] 施設内感染、食中毒事例

		RT-PCR法		合 計
		+	-	
IC kit 法	+	9	0	9
	-	2	9	11
合 計		11	9	20

RT-PCR 法との一致率: 90 %

感 度: 81.8%

特異性 : 100 %

平成 19 年度 厚生労働省新興再興感染研究事業
「広域における食品由来感染症を迅速に探知するために必要な情報に関する研究」
分担研究報告書

カリシウェブの整備

分担研究者 染谷雄一、片山和彦（国立感染症研究所ウイルス第二部）

要旨 ノロウイルス (NoV)、サポウイルス (SaV) の遺伝子型を判定するためには、分子系統解析が必須である。しかし、遺伝子型の判定基準の策定は模索の段階にある事に加え、データベース上の NoV、SaV の塩基配列データは、日々新規登録、更新が行われ、刻々と変化している。本研究では遺伝子解析に用いるカリシウイルス塩基配列データのサブデータベースをカリシウェブ上に作り、データの共有化を計るとともに、自動アップデートするためのオートパイロットプログラムの構築を試みた。

協力研究者 三瀬 敬治（札幌医科大学・医学部・衛生学）

A. 研究目的

ノロウイルス (NoV) は、約 7500 塩基のプラス一本鎖 RNA をゲノムに持つウイルスである。NoV のゲノムには 3 つの蛋白質コード領域 (open reading frame; ORF) が存在しており、ORF1; 非構造蛋白質、ORF2; 構造蛋白質 1 (VP1)、ORF3 ; 構造蛋白質 2 (VP2) をコードしている。NoV のゲノム塩基配列は多様性に富んでおり、ゲノム塩基配列の相同性に基づきいくつかのグループ、遺伝子型に分類されている。これまでに、非構造蛋白質の RNA 依存性 RNA 合成酵素 (RNA dependent RNA polymerase, RdRp もしくは polymerase) をコードする領域を用いた遺伝子型分類や、VP1 領域を用いた遺伝子型分類が報告されている。特に我々の構築した VP1 領域を用いた遺伝子型分類は、NoV 粒子の抗原性をよく反映するため、遺伝子型分類の主流となってきた。

最近、流行の主流を担っている NoV は、VP1 領域のタイピングによって GII/4 に分類されるウイルスである。オランダの研究グループは、この GII/4 を細分化するため RdRp 領域を用いたタイピングを行い、流行株を区別している。彼らは、RdRp の遺伝子配列の違いが NoV の複製効率に関与し流行株出現の

一因となる可能性を示唆し、RdRp によるタイピングを推進しようとしている)。NoV は RdRp 領域と VP1 領域の間でゲノムの組換え (リコンビネーション) を起こすことが知られている。この領域は ORF1, 2 junction と呼ばれており、リコンビネーションのホットスポットとして認知されている。NoV のゲノムリコンビネーションは、NoV の宿主への適合やウイルス病原性の変化等を理解する上で重要な現象だが、NoV の遺伝子型分類を混沌とした状態に陥れている。リコンビナント株は ORF1, 2 junction 上流の RdRp 領域を用いた遺伝子型分類と、下流の VP1 領域を用いた遺伝子型分類で異なる結果を与えるからである。ゲノムリコンビネーションの問題は、NoV ばかりでなく、サポウイルスにも認められており、カリシウイルス科の特徴である可能性がある。

本研究では、世界三大データベース (DDBJ, Genbank, EMBL) 上に点在しているカリシウイルスゲノムデータを集積し、サブデータベースをカリシウェブ上に作製すること、このサブデータベースをウェブ上で共有することにより、日本国内ばかりでなく、世界のカリシウイルス研究者が共通の情報を元に遺伝子解析ができるように解析ツールを備えたウェブページの作成を試みた。本年度は、オートパイロットプログラムの構築と、サブデータベースの作成を行った。

B. 材料と方法

世界三大データベース (DDBJ, Genbank, EMBL) の一つ DDBJ より、オートパイロットプログラムでカリシウイルスのデータをダウンロードし、サブデータベースを構築するスクリプトを作製した。テストプログラムのキーワード候補は、Calicivirus, Caliciviridae, Human calicivirus, Norovirus, Norwalk virus, Norwalk like virus, Sapovirus, Sapporo virus, Sapporo like virus とした。プログラム評価のための任意のデータベース上の配列を定め、プログラムを評価した。プログラム評価のための配列のうち、Sapovirus のみを表 1 に示した。

C. 結果

1) オートパイロットプログラム

Calicivirus, Caliciviridae, Norovirus, Norwalk virus, Sapovirus, Sapporo virus をキーワードとしたオートパイロットでは、10000 件以上のデータがピックアップされた。しかし、このパイロットプログラムでは、Norwalk-like virus, Sapporo-like virus がヒットしなかった。次に候補キーワード全てを使用して、サーチを行ったところ、1 万 5 千件に近いデータがピックアップされ、テスト対象とした配列は全て集積可能であった。

このオートパイロットで集積されたデータは、全てのデータが一枚のテキスト上に記載されており、アクセッションナンバーごとに個別データ形式ではない。アクセッションナンバーごとのカード型データベースとしてサブデータベースを構築するためには、DDBJ からピックアップされたデータを切り分ける必要がある。そこで、ピックアップされたデータよりアクセッションナンバーをキーとして、DDBJ に再検索をかけ、データをダウンロードするスクリプトをオートパイロットプログラムに組み込んだ。切り分け回収用のスクリプトにより、アクセッションナンバーごとに切り分けられたカード型データの取得できることが明らかになった。

以降、テストごとに 15000 件あまりのデータを用い

るとプログラム評価に時間がかかるため、Sapovirus のみを検索対象として用い、ピックアップされた 857 件を対象にスクリプトの評価を行った。

Sapovirus の 857 件には、評価用配列が全て含まれていた。作製されたデータベースは、アクセッションナンバーごとのカード型データベースとなった。このサブデータベースを対象に、検索スクリプトを組み、データタグ (Accession, nucleotide length, organism, host, taxonomy, isolate, country, strain, last_update, CDS) に対する検索をテストした。図 1 に、検索ページを示した。また、表 2 に検索結果出力の例を示した。検索プログラムは正常に動作した。

D. 考察

オートパイロットプログラムを使用した Sapovirus のサブデータベース作成と検索プログラムのテストランに成功した。キーワードを拡張してカリシウイルスを網羅するようにオートパイロットを作動させると、約 15000 件に上るシーケンスデータをカード型データファイルとして取得することが可能だった。スクリプト実行中にパケットの送受信傷害によるネットワーク中断が発生すると、スクリプトエラーに直結するため、通信環境の整備と、サーバーの能力向上が必要であると思われた。

検索プログラムに関しては、問題はなく、目的とする情報が表示されることが確認された。検索項目に、塩基配列、アミノ酸配列を加えていたが、実際の検索では、出力結果から各データのダウンロードを実行するので、これらを表示する必要はないと考えられた。通常、データ解析を行う際には、必要な情報を取り出した後、解析用プログラムに適合したデータフォーマットに整えた上、解析用ソフトウェアに転送することになる。今回テストした検索プログラムでは、サブデータベースへのリンク、サブデータベースのデータファイルを選択するボタン、オンライン解析ソフトウェアへの出力の機能を持たせていない。今後、これらの機能を付加する必要がある。

D. 結論

1. オートパイロットプログラムによる、DDBJからのカリシウイルスデータの収集、サブデータベース構築に、部分的に成功した。
2. カリシウェブページ上からサブデータベース検索が行えるよう、検索プログラムのβ版のランに成功した。

E. 研究業績

1) 論文発表

Oka T, Yamamoto M, Yokoyama M, Ogawa S, Hansman GS, Katayama K, Miyashita K, Takagi H, Tohya Y, Sato H, Takeda N, 2007. Highly conserved configuration of catalytic amino acid residues among calicivirus-encoded proteases. *J Virol* 81: 6798-806.

Susana Guix, Miyuki Asanaka, Kazuhiko Katayama, Sue E. Crawford, Frederick H. Neill, Robert L. Atmar, and Mary K. Estes. Norwalk Virus RNA Is Infectious in Mammalian Cells. *J Virol*, 81: 12238-12248.

片山和彦 ノロウイルス複製系における最近の知見 *IASR* Vol. 28 p 293-294 : 2007年10月号

片山和彦 養護教諭のなんても質問箱 ノロウイルスについて 心と体の健康, Vol. 11 No. 117 Nov. p86-88, 2007 株式会社 健学社

片山和彦 ノロウイルスの遺伝子型 *IASR*, <http://idsc.nih.go.jp/pathogen/refer/norokaisetu.html>

2) 著書 (総説)

Hansman GS, Oka T, Katayama K, Takeda N, 2007. Human sapoviruses: genetic diversity, recombination, and classification. *Rev Med Virol* 17: 133-41.

3) 学会発表

Hansman GS, Sano D, Ueki U, Imai T, Oka T, Katayama K, Takeda N, Omura T, 2007.9. Sapovirus in Water, Japan. 14th International Symposium on Health-Related Water Microbiology. Tokyo.

Someya Y, Takeda N, Wakita T, 2007.5. Glutamate 54 of Norovirus 3C-like Protease. The 8th International Symposia on Positive-Strand RNA Viruses. Washington DC.

染谷雄一, 武田直和, 脇田隆字, 2007.10. ノロウイルス3C様プロテアーゼを構成するアミノ酸ザンキの役割. 第55回日本ウイルス学会学術集会. 札幌.

染谷雄一 第8回プラス鎖RNAウイルス国際シンポジウムの報告 第19回ウイルス性下痢症研究会、2007年10月、札幌

小澤一弘, 岡智一郎, Hansman GS, 片山和彦, 武田直和, 2007.10. 調理従事者から検出されたノロウイルスの遺伝子解析. 第55回日本ウイルス学会学術集会. 札幌.

山本真民, 岡智一郎, Hansman GS, 宮下佳奈, 片山和彦, 小川智子, 脇田隆字, 武田直和, 2007.10. サポウイルス粒子形成機構の解析. 第55回日本ウイルス学会学術集会. 札幌.

宮下佳奈, 岡智一郎, Hansman GS, 山本真民, 片山和彦, 小川智子, 脇田隆字, 武田直和, 2007.10. 哺乳動物細胞を用いたサポウイルス組換え粒子の発現. 第55回日本ウイルス学会学術集会. 札幌.

岡智一郎, 横山勝, 宮下佳奈, 山本真民, Hansman GS, 片山和彦, 小川智子, 脇田隆字, 佐藤裕徳, 武田直和, 2007.10. カリシウイルスプロテアーゼの基質認識機構の共通性. 第55回日本ウイルス学会学術集会. 札幌.

横山勝, 岡智一郎, 山本真民, 宮下佳奈, Hansman GS, 片山和彦, 小川智子, 神田忠仁, 武田直和, 佐藤裕徳, 2007.10. サポウイルスプロテアーゼ・基質複合体の構造解析. 第55回日本ウイルス学会学術集会. 札幌.

片山和彦 他4名 片山和彦, Sharp T, Ling W, Guix S, Estes M K. Complete reverse genetics system of the human norovirus 第55回日本ウイルス学会学術集会、2007年10月、札幌

片山和彦 ノロウイルスの新知見 ウイルス性下痢
症研究会第19回学術集会、2007年10月、札幌
片山和彦 10月26日(新宿) ノロウイルス感染症(食
中毒)と予防対策」株式会社中部衛生検査セン
ター 食品衛生研修会

F. 健康危機情報

なし

E. 知的財産の出願、登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

Genus	Species	Host	Accession	Strain	Year of isolated	Country	nt length
Sapo	Sapporo virus	Porcine	AB221130	K7JJP	2002	JP	7144
Sapo	Sapporo virus	Porcine	AF182760	Coden	1990	US	7320
Sapo	Sapporo virus	Human	AJ249939	Bristol/98/uk	1998	UK	7490
Sapo	Sapporo virus	Human	AY237419	Mc2	2000	Thailand	7490
Sapo	Sapporo virus	Human	AY237420	Mc10	2000	Thailand	7458
Sapo	Sapporo virus	Human	AY237422	Mc114	2000	Thailand	7429
Sapo	Sapporo virus	Human	AY237423	N21	2000	Thailand	7429
Sapo	Sapporo virus	Human	AY603425	SakaiC12	2001	JP	7476
Sapo	Sapporo virus	Human	AY646853	Nongkhai50	Apr,2003	Thailand	7429
Sapo	Sapporo virus	Human	AY646854	Chanthaburi74	Mar,2003	Thailand	7429
Sapo	Sapporo virus	Human	AY646855	SK15	Dec, 2002	Thailand	7459
Sapo	Sapporo virus	Human	AY646856	Nongkhai24	Dec, 2002	Thailand	7500
Sapo	Sapporo virus	Human	AY694184	Hu/Dresden/pJG-Sap01/DE	2004	GE	7429
Sapo	Sapporo virus	Human	DQ058829	Ehime1107	1999	JP	7427
Sapo	Sapporo virus	Human	DQ125333	SW278	2003	SW	7437
Sapo	Sapporo virus	Human	DQ125334	SW314	2003	SW	7437
Sapo	Sapporo virus	Human	DQ366344	Ehime475	2004	JP	7500
Sapo	Sapporo virus	Human	DQ366345	Ehime643	Mar,2000	JP	7447
Sapo	Sapporo virus	Human	DQ366346	Ehime1596	1999	JP	7428
Sapo	Sapporo virus	Human	X86560	Manchester	1993	UK	7431

平成 19 年度 厚生労働省新興再興感染研究事業
「広域における食品由来感染症を迅速に探知するために必要な情報に関する研究」
分担研究報告書

カリシウェブを利用した Norovirus 遺伝子型分類法の標準化

分担研究者 片山和彦、染谷雄一（国立感染症研究所ウイルス第二部）

要旨 ノロウイルス（NoV）の遺伝子型を判定するためには、分子系統解析が必須である。しかし、遺伝子型の判定基準の策定は、未だ模索の段階にある。本研究ではインターネット上に構築したカリシウェブに欧米諸国及び日本を含むアジア地域で頻りに利用されている各遺伝子型の基準配列をまとめ、アップロードし、遺伝子解析の操作ガイドと共に公開した。

協力研究者 鈴木 義幸（国立遺伝学研究所）、
三瀬 敬治（札幌医科大学・医学部・衛生学）

A. 研究目的

ノロウイルス（NoV）は、約 7500 塩基のプラス一本鎖 RNA をゲノムに持つウイルスである。NoV のゲノムには 3 つの蛋白質コード領域（open reading frame; ORF）が存在しており、ORF1; 非構造蛋白質、ORF2; 構造蛋白質 1 (VP1)、ORF3 ; 構造蛋白質 2 (VP2) をコードしている。NoV のゲノム塩基配列は多様性に富んでおり、ゲノム塩基配列の相同性に基づきいくつかのグループ、遺伝子型に分類されている。これまでに、非構造蛋白質の RNA 依存性 RNA 合成酵素（RNA dependent RNA polymerase, RdRp もしくは polymerase）をコードする領域を用いた遺伝子型分類や、VP1 領域を用いた遺伝子型分類が報告されている。特に我々の構築した VP1 領域を用いた遺伝子型分類は、NoV 粒子の抗原性をよく反映するため、遺伝子型分類の主流となってきた。

最近、流行の主流を担っている NoV は、VP1 領域のタイピングによって GII/4 に分類されるウイルスである。オランダの研究グループは、この GII/4 を細分化するため RdRp 領域を用いたタイピングを行い、流行株を区別している。彼らは、RdRp の遺伝子配列の違いが NoV の複製効率に関与し流行株出現の

一因となる可能性を示唆し、RdRp によるタイピングを推進しようとしている。NoV は RdRp 領域と VP1 領域の間でゲノムの組換え（リコンビネーション）を起こすことが知られている。この領域は ORF1, 2 junction と呼ばれており、リコンビネーションのホットスポットとして認知されている。NoV のゲノムリコンビネーションは、NoV の宿主への適合やウイルス病原性の変化等を理解する上で重要な現象だが、NoV の遺伝子型分類を混沌とした状態に陥れている。リコンビナント株は ORF1, 2 junction 上流の RdRp 領域を用いた遺伝子型分類と、下流の VP1 領域を用いた遺伝子型分類で異なる結果を与えるためである。

NoV は、現在までに VP1 領域の遺伝子型分類を用いて、すでに 36 種類以上のタイプが報告されているが、さらに新たな遺伝子型の発見報告が続いている。しかし、新たな遺伝子型を定義する共通の決まりがなく、研究者は、独自の方法で、新たな遺伝子型を判定し、独自に命名した遺伝子型番号を付けるため、NoV の遺伝子型分類そのものが混沌とした状況に陥っている。そこで、本研究では、遺伝子型分類基準策定を目指し、インターネット上に構築したカリシウェブに、欧米諸国及び日本を含むアジア地域で頻りに利用されている NoV の各遺伝子型の基準配列、遺伝子解析の操作ガイドを公開し、遺伝子型

分類法の共通化を目指した。

B. 材料と方法

国際ウイルス命名委員会(International Committee on Taxonomy of Viruses; ICTV、<http://www.ICTVonline.org/index.asp>)のウイルスデータベース; ICTVdBの、カリシウイルスの項目(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/12000000.htm>)に、カリシウイルス科に属するウイルス属として定義されている4つのウイルス属(genus)、*Vesivirus*, *Lagovirus*, *Sapovirus*, *Norovirus*のうち、*Norovirus*のカテゴリーに入るゲノム塩基配列を対象として解析を行った。用いた塩基配列は、Fields Virology 5に記載された基準配列、Zhengらの論文(Zheng, D. P., T. Ando, R. L. Fankhauser, R. S. Beard, R. I. Glass, and S. S. Monroe. 2005. *Norovirus classification and proposed strain nomenclature. Virology.*)に記載された基準配列、そして、我々の論文(Kageyama, T., M. Shinohara, K. Uchida, S. Fukushi, F. B. Hoshino, S. Kojima, R. Takai, T. Oka, N. Takeda, and K. Katayama. 2004. *Coexistence of multiple genotypes, including newly identified genotypes, in outbreaks of gastroenteritis due to Norovirus in Japan. J Clin Microbiol* 42:2988-95. Katayama, K., H. Shirato-Horikoshi, S. Kojima, T. Kageyama, T. Oka, F. Hoshino, S. Fukushi, M. Shinohara, K. Uchida, Y. Suzuki, T. Gojobori, and N. Takeda. 2002. *Phylogenetic Analysis of the Complete Genome of 18 Norwalk-like Viruses. Virology* 299:225.)に記載された基準配列とした。塩基配列データの解析、分子系統樹の作製には、G-InforBIOソフトウェアパッケージを用いた。

C. 結果及び考察

<Capsid N/S領域の塩基配列を用いた遺伝子型分類> VP1のN末端領域のパーシャルシーケンスを用いたタイピングは、PCRのゴールドスタンダードとなっているSK primer seriesによる増幅産物

から得られた塩基配列情報を用いて行った。基準配列ファイルには、できる限り完全長塩基配列の報告されている株と論文として報告され、データベースから塩基配列が取得可能な株を選択した。更に、Fields Virology 5th editionに記載されているゲノタイプ標準株も含めて解析を行った。アクセションナンバーの左側に我々の方法に基づいたゲノタイプ番号を、最後尾にFields Virology 5th editionに基づいたゲノタイプ番号を記載した。このファイルを用いて作製したNJ法による分子系統樹を図1に示した。

<CDCの提唱する遺伝子型分類> CDCは、前述のVP1のN-terminal & S region (N/S region)領域を用いたタイピングでは遺伝子型分類が正確にできないとして、VP1領域全長の塩基配列をアミノ酸配列に変換して、最尤法でタイピングする方法を構築して報告した。この方法に準拠して遺伝子型分類を行う場合、VP1領域全長のアミノ酸配列情報、つまりVP1領域全長の塩基配列情報が必要になる。Fields Virology 5th editionは、CDCとの事前打ち合わせに基づいて編集されており、CDCの方法に記載された塩基配列を標準株として用いている。表1に、Fields Virology 5th editionに記載された標準株と、我々が用いている標準株の対応を示した。

本法とN/S領域を用いた方法との違いは、Alphatron株のクラスターの位置、解析に要求する塩基配列・アミノ酸配列の長さである。まず、Alphatron株のクラスターの位置について説明する。本方法では、Alphatron株のクラスターがGIIクラスターの外から分岐するため、GIVとしてAlphatron株のクラスターを認識しやすくなる。しかし、分子遺伝学的な計算に基づくAlphatron株と他のゲノグループの株との距離は、N/S領域を用いた場合と大差はなく、ゲノグループ間との距離と、ゲノタイプ間との距離の中間値を取っており、統計学的に有意に分別することはできない。此所には研究者の主観が入り込む恐れがある。いずれにせよ、抗原性の違いを予測する目的でタイピングを行うのであれば、どちらの方法で行っても分子系統関係に大差はな

い事が明らかとなった。

Capsid N/S 領域の塩基配列を用いた遺伝子型分類を行うために FASTA フォーマットで用意したの基準配列は、感染情報センターの IASR (<http://idsc.nih.gov/pathogen/refer/noro-kaisetu.html>) 上に公開すると共に、CaliciWeb (<http://teine.cc.sapmed.ac.jp/~calici/modules/newst>) 上にも公開した。さらに、この基準配列ファイルを用いて NoV の遺伝子型分類を行う方法をスライドにまとめ、同様に CaliciWeb 上に公開した。現在、CaliciWeb ホームページのフロントページデザイン変更と、ホームページ上で任意の配列を入力することで、標準配列を用い NoV 遺伝子型分類を簡便に行うことができる解析ページを作成中である。

D. 結論

1. Capsid N/S 領域の塩基配列を用いた遺伝子型分類を行うために FASTA フォーマットで用意したの基準配列は、感染情報センターの IASR (<http://idsc.nih.gov/pathogen/refer/noro-kaisetu.html>) 上に公開すると共に、CaliciWeb (<http://teine.cc.sapmed.ac.jp/~calici/modules/newst>) 上にも公開した。
2. この基準配列ファイルを用いて NoV の遺伝子型分類を行う方法をスライドにまとめ、同様に CaliciWeb 上に公開した。
3. NoV の遺伝子型分類法のガイドラインを示した。

E. 研究業績

1) 論文発表

Oka T, Yamamoto M, Yokoyama M, Ogawa S, Hansman GS, Katayama K, Miyashita K, Takagi H, Tohya Y, Sato H, Takeda N, 2007. Highly conserved configuration of catalytic amino acid residues among calicivirus-encoded proteases. *J Virol* 81: 6798-806.

Susana Guix, Miyuki Asanaka, Kazuhiko Katayama, Sue E. Crawford, Frederick H. Neill, Robert L. Atmar, and Mary K. Estes. Norwalk Virus RNA

Is Infectious in Mammalian Cells. *J Virol*, 81: 12238-12248.

片山和彦 NoV 複製系における最近の知見 *IASR* Vol. 28 p 293-294: 2007年10月号

片山和彦 養護教諭のなんでも質問箱 NoV について「心と体の健康」, Vol. 11 No. 117 Nov. p86-88, 2007 株式会社 健学社

片山和彦 NoV の遺伝子型 *IASR*, <http://idsc.nih.gov/pathogen/refer/noro-kaisetu.html>

2) 著書 (総説)

Hansman GS, Oka T, Katayama K, Takeda N, 2007. Human sapoviruses: genetic diversity, recombination, and classification. *Rev Med Virol* 17: 133-41.

3) 学会発表

Hansman GS, Sano D, Ueki U, Imai T, Oka T, Katayama K, Takeda N, Omura T, 2007.9. Sapovirus in Water, Japan. 14th International Symposium on Health-Related Water Microbiology. Tokyo.

Someya Y, Takeda N, Wakita T, 2007.5. Glutamate 54 of Norovirus 3C-like Protease. The 8th International Symposia on Positive-Strand RNA Viruses. Washington DC.

染谷雄一, 武田直和, 脇田隆字, 2007.10. NoV3C 様プロテアーゼを構成するアミノ酸ザンキの役割. 第55回日本ウイルス学会学術集会. 札幌.

染谷雄一 第8回プラス鎖RNAウイルス国際シンポジウムの報告 第19回ウイルス性下痢症研究会、2007年10月、札幌

小澤一弘, 岡智一郎, Hansman GS, 片山和彦, 武田直和, 2007.10. 調理従事者から検出された NoV の遺伝子解析. 第55回日本ウイルス学会学術集会. 札幌.

山本真民, 岡智一郎, Hansman GS, 宮下佳奈, 片山和彦, 小川智子, 脇田隆字, 武田直和, 2007.10. サポウイルス粒子形成機構の解析. 第55回日本ウイルス学会学術集会. 札幌.

宮下佳奈, 岡智一郎, Hansman GS, 山本真民, 片山和彦, 小川智子, 脇田隆字, 武田直和, 2007. 10. 哺乳動物細胞を用いたサポウイルス組換え粒子の発現. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会. 札幌.

岡智一郎, 横山勝, 宮下佳奈, 山本真民, Hansman GS, 片山和彦, 小川智子, 脇田隆字, 佐藤裕徳, 武田直和, 2007. 10. カリシウイルスプロテアーゼの基質認識機構の共通性. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会. 札幌.

横山勝, 岡智一郎, 山本真民, 宮下佳奈, Hansman GS, 片山和彦, 小川智子, 神田忠仁, 武田直和, 佐藤裕徳, 2007. 10. サポウイルスプロテアーゼ・基質複合体の構造解析. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会. 札幌.

片山和彦 他4名 片山和彦, Sharp T, Ling W, Guix S, Estes M K. Complete reverse genetics

system of the human norovirus 第55回日本ウイルス学会学術集会、2007年10月、札幌

片山和彦 NoVの新知見 ウイルス性下痢症研究会第19回学術集会、2007年10月、札幌

片山和彦 10月26日(新宿) NoV感染症(食中毒)と予防対策」株式会社中部衛生検査センター食品衛生研修会

F. 健康危機情報

なし

E. 知的財産の出願、登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

表1 Genotype標準株の一覧

Capsid N/S regionに基づく genotype				VP1全長アミノ酸配列に基づく genotype			
Genogroup I	GI/1	Accession number	Strain name	Genotype number	Accession number	Strain name	Strain name
	GI/1	M87661	Norwalk/68/US*	GI.1	M87661	Norwalk/68/US*	Norwalk/68/US*
	GI/2	L07418	Southampton/91/UK*	GI.2	L07418	Southampton/91/UK*	Southampton/91/UK*
	GI/3	U04469	DesertShield/90/US	GI.3	U04469	DesertShield/90/US	DesertShield/90/US
	GI/4	AB042808	Chiba407/87/JP*	GI.4	AB042808	Chiba407/87/JP*	Chiba407/87/JP*
	GI/5	AJ277614	Musgrove/89/UK	GI.5	AJ277614	Musgrove/89/UK	Musgrove/89/UK
	GI/6	AF093797	Hesse(BS5)/98/GE*	GI.6	AF093797	Hesse(BS5)/98/GE*	Hesse(BS5)/98/GE*
	GI/7	AJ277609	Winchester/94/UK	GI.7	AJ277609	Winchester/94/UK	Winchester/94/UK
	GI/8	AB081723	WUG1/00/JP*	GI.8	AF538679	Boxer/01/US**	Boxer/01/US**
	GI/9	AB039774	SaitamaSzUG1/99/JP*				
	GI/10	AF538679	Boxer/01/US**				
	GI/11	AB058547	SaitamaKU8GI/99/JP				
	GI/12	AB058525	SaitamaKU19aGI/00/JP				
	GI/13	AB112132	SaitamaT35aGI/01/JP				
	GI/14	AB112100	SaitamaT25GI/01/JP				
Genogroup II	GII/1	U07611	Hawaii*	GII.1	U07611	Hawaii*	Hawaii*
	GII/2	X81879	Melksham	GII.2	X81879	Melksham	Melksham
	GII/3	AB067542	SaitamaU201*	GII.3	U02030	Tronto	Tronto
	GII/4	X86557	Lordsdale/93/UK*	GII.4	X76716	Bristol	Bristol
	GII/5	AJ277607	Hillingdon/90/UK	GII.5	AJ277607	Hillingdon/90/UK	Hillingdon/90/UK
	GII/6	AB039776	SaitamaU3*	GII.6	AJ277620	Seacroft/90/UK	Seacroft/90/UK
	GII/7	AJ277608	Leeds/90/UK	GII.7	AJ277608	Leeds/90/UK	Leeds/90/UK
	GII/8	AB067543	SaitamaU25*	GII.8	AF195848	Amsterdam	Amsterdam
	GII/9	AY054299	IdahoFalls	GII.9	AY038599	VA97207/97	VA97207/97
	GII/10	AY237415	Mc37*	GII.10	AF427118	Erfurt/546/00/DE	Erfurt/546/00/DE
	GII/11	AB112221	SaitamaT29GII	GII.11	AB074893	SwNov/Sw918/97/JP	SwNov/Sw918/97/JP
	GII/12	AB039775	SaitamaU1*	GII.12	AJ277618	Wortley/90/UK	Wortley/90/UK
	GII/13	AY130761	M7/99/US	GII.13	AY113106	Fayettevil/98/US**	Fayettevil/98/US**
	GII/14	AB078334	Kashiwa47	GII.14	AY130761	M7/99/US**	M7/99/US**
	GII/15	AB058582	SaitamaKU80aGII	GII.15	AY130762	J23/1999/US**	J23/1999/US**
	GII/16	AB112260	SaitamaT53GII	GII.16	AY502010	Triffin/1999/US	Triffin/1999/US
	GII/17	AF195847	Alphatron	GII.17	AY502009	CSE1	CSE1
	GII/18	AB083780	Akita-Yuri	GII.18	AY823304	SwNov/OHQM101	SwNov/OHQM101
	GII/19	EF630529	Hokkaido299	GII.19	AY823306	SwNov/OHQM170	SwNov/OHQM170

*Full-length genome sequence

**Unpublished

消化管寄生性原虫症に関する検査法および分子疫学的研究

分担研究者：八木田健司 国立感染症研究所 寄生動物部
協力研究者：板垣 匡 岩手大学農学部 応用獣医学講座
協力研究者：浅野由紀子 愛媛県衛生研究所 衛生研究課
協力研究者：泉山信司 国立感染症研究所 寄生動物部

研究要旨

クリプトスポリジウム症およびジアルジア症の国内発生動向に関し、両疾患に関する我が国と諸外国の最新統計データを比較し、報告数および発生率ともに諸外国よりも低い我が国特異的な状況を明らかにした。特に諸外国では感染報告数のおよそ 1/3 を占める 10 才以下の低年齢層における感染が、国内では統計上ほとんど表れていない点が注目され、この年齢層に関する調査の必要性が指摘された。そのパイロット的研究として、今回、愛媛県における発生動向調査で感染性胃腸炎として検査される試料のうち、原因不明となった試料に関し、迅速簡便な検査法である免疫クロマト法を用いて原虫検出を試みた。その結果、1.3%の割合ではあるが、原因不明試料中に原虫が検出され、感染性胃腸炎の原因検索として原虫をも対象とすべき必要性があることが明らかとなった。発生動向という即時的情報を得るには、現状の検査法では対応が難しいことが予想され、より簡便迅速な方法の導入が求められるが、今回試用した免疫クロマト法は、その要求に応える有用性を備えるものと考えられた。国内の実態としては低年齢層における感染の存在が想定されることから、その感染源の解明が今後の課題となる。水系環境汚染は一つの要因となり得るが、東北地方の北上川の流域調査では、ヒト感染性タイプのジアルジアによる流域汚染と下水放流による高汚染域への注意が指摘された。適切な検査法に基づき国内の発生動向を正確に把握することは、種々の感染リスクを低減し、流行の阻止につながるものである。低年齢層あるいはその他のリスクグループに関してさらに広範な調査が必要と考えられる。

A. 研究目的

クリプトスポリジウム症ならびにジアルジア症は、現在感染症法の第 5 類に分類され、発生動向調査により疾患の発生動向を

把握することが求められている。かつてジアルジア症に関しては国内においても高い感染率がみられたが、現在、統計上は 100 例前後にとどまっている。クリプトスポリ

ジウム症に関しては新興感染症ということもあり国内調査は進んでおらず、集団感染時を除けば統計上は数十例にとどまる。一方で国外をみるとこれら疾患は下痢症の要因として重要で、その報告数も多いことが知られる。公衆衛生上の対策の根拠として国内の統計の持つ意味は大きいものがあると考えられ、得られた統計が実態を反映しているものかを検証することは重要と考えられる。本研究では、クリプトスポリジウム症およびジアルジア症の国内発生動向に関し、両疾患に関する我が国と諸外国の最新統計データを比較し、低年齢層における実態が不明であるとの結果が得られたことから、発生動向調査で得られる感染性胃腸炎由来試料を用いて低年齢層における原虫感染率を調べた。その際、迅速簡便な免疫クロマト法を検出法として用い、その有用性を併せて調べた。また、水系環境の汚染が感染要因の一つとして重要視されることから、北上川の汚染実態を調査した。

B. 研究方法

B-1 国内外のクリプトスポリジウム症ならびにジアルジア症の統計調査

我が国を含め各国が web 上で公開している保健・感染症関連研究施設からの感染症サーベイランスに関する統計データを主に利用した。国内統計情報に関しては、国立感染症研究所、感染症情報センターが公表する感染症発生動向調査事業年報 (<http://idsc.nih.go.jp/idwr/CDROM/Main.htm>) を用いた。これらのデータから年次報告数、10万人あたり報告数、年齢階級別報告数、その他の項目に関して比較を行なった。

表-1 に nationally notifiable infectious diseases surveillance として調査結果を公表している国外の web サイトをまとめた。

B-2 免疫クロマト法による原虫症の迅速検査

材料：2004年1月～12月および2007年1月～12月の間に病原体定点において感染性胃腸炎と診断され愛媛県衛生研究所搬入された検体で、当所の病原体検査でウイルス及び細菌のいずれも検出されなかった検体のうち検査が可能であった凍結保存糞便検体を用いた（2004年分129検体、2007年分98検体）。また集団感染事例に関連して2004年長野集団発生事例(*C. parvum* ヒト型感染)ならびに2006年愛媛集団発生事例(*C. meleagridis* 感染)において得られた凍結保存糞便検体も検査に供した。その他、感度試験のために感染マウス糞便あるいは下痢の子牛糞便(いずれも *C. parvum* 動物型を含む)を用いた。

検査方法：前年度と同様、市販の Meridian 社製のクリプトスポリジウム・ジアルジア検出用免疫クロマト法キット ImmunoCard STAT を用いた。使用は試験キット添付の操作手順に従い、また結果の判定もキット添付の判定基準に従った。

B-3 北上川水系における原虫汚染状況調査

2004年9月から2005年8月、北上川本流2地点と支流3地点より採水した(図-4)。採取した表流水10Lをメンブランフィルター法によりろ過し、濃縮後、シヨ糖遠心浮遊法で試料を精製濃縮した。FITC 標識抗 *Giardia/Cryptosporidium* 抗体を用いた直接蛍光抗体染色法を用いて落射蛍光微分干渉顕微鏡で観察し、原虫数を計数した。また