

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

食品中のウイルスの制御に関する研究

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 武田 直和

平成20(2008)年 4月

目次

I. 総括研究報告書		
食品中のウイルスの制御に関する研究	武田 直和	1
II. 分担研究報告書		
1. イムノクロマトグラフ法で食品中のノロウイルスは検出できるか	田中 智之	13
2. 愛知県内の下水処理場流入下水からのノロウイルスとサポウイルスの検出状況	小林 慎	19
3. 豚における E 型肝炎ウイルスの感染時期	恒光 裕	25
4. 表面汚染が推定される食品からのノロウイルス検出法に関する検討	野田 衛	29
5. 臨床検体での HAV RT-LAMP 法	米山 徹夫	35
6. 培養細胞における E 型肝炎ウイルスの増殖の条件の検討	李 天成	43
7. カキが原因と疑われた食中毒事例糞便中の下痢症ウイルスの解析	岡 智一郎	45
8. Detection of human enteric viruses in Japanese clams	グラント・ハンスマン	53
9. ノロウイルスと血液型抗原との結合に関する研究	白土 東子	61
III. 協力研究報告書 I		
1. 協力研究総括報告	田中 智之	67
2. 北海道における 2007/08 シーズンのノロウイルスによる集団胃腸炎発生状況	吉澄 志磨	71
3. 2006/07 シーズンのノロウイルス (NV) 分子疫学的解析及び 2007 年市販生カキの NV 汚染実態調査	三上 稔之	81
4. アミラーゼを用いたカキからのノロウイルス濃縮法の検討について	植木 洋	95

5. パンソルピン・トラップ法による食品検体からの ノロウイルスの回収	齋藤 博之-----	103
6. 流入下水中ノロウイルス濃度から推察されるノロウイルス 胃腸炎の流行状況と下水処理によるノロウイルス除去について	高橋 朱実-----	113
7. 下水流入水からのノロウイルス検出と隣接海域の イワガキ汚染の状況	滝澤 剛則-----	117
8. パンソルピン・トラップ法による食品検体からの ノロウイルスの回収 (検討2)	東方 美保-----	125
9. 堺市内下水におけるノロウイルスの動態	内野 清子-----	135
10. 集団発生事例および散発性胃腸炎からの ノロウイルス検出状況	飯塚 節子-----	143
11. カキにおけるノロウイルスの量的分布と推移および ノロウイルス簡易検出法のカキへの応用	福田 伸治-----	151
12. 散発性胃腸炎および食中毒事例からのサボウウイルスの検出	近藤 玲子-----	157
13. 下水処理施設における流入水のノロウイルスの消長 (2007)	船津丸 貞幸-----	167
14. 九州4自治体におけるノロウイルスの検出と遺伝子型 - (2007年1月~2007年12月) -	松岡 由美子-----	177
15. サボウウイルスに対する単クローン抗体の作製とその有用性	北元 憲利-----	187
IV. 協力研究報告書 II		
1. 協力研究総括報告	野田 衛-----	193
2. 愛知県における嘔吐物からのノロウイルス検出状況	小林 慎-----	203
3. ノロウイルス感染患者から採取された嘔吐物中の ウイルス定量および検出ウイルスの遺伝子解析	入谷 展弘-----	207
4. 嘔吐物中のノロウイルスの定量および遺伝子解析	吉田 徹也-----	213

5. 嘔吐物に排泄されるノロウイルス量の把握と感染源としての評価	福田 伸治	219
6. 嘔吐後の口腔内に残存するノロウイルスの定量	田村 務	223
7. 嘔吐物が関与したノロウイルスの集団発生について	篠崎 邦子	231
8. 嘔吐物の関与が大と考えられた2事例についての考察	斎藤 博之	239
9. 杉並区で発生したノロウイルス集団感染事例の疫学的分析	谷口 力夫	243
10. ノロウイルス発生施設の消毒方法とその効果確認方法について	小暮 実	257
11. 患者と調理者から検出されたノロウイルスの遺伝子解析	岩切 章	265
12. 胃腸炎集団発生および健康調理従事者からのノロウイルスの 検出と遺伝子型の比較	林 志直	271
V. 研究成果の刊行に関する一覧		277

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

食品中のウイルスの制御に関する研究

平成 19 年度 総括研究報告書

主任研究者 武田 直和

平成 20 (2008) 年 4 月

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）

総括研究報告書

食品中のウイルスの制御に関する研究

主任研究者 武田 直和 国立感染症研究所ウイルス第二部第一室長

研究要旨 ウイルス性食中毒の主要な原因となっている A 型肝炎ウイルス、E 型肝炎ウイルス、ノロウイルス、およびサポウイルスについて、地方衛生研究所等の協力を得て、検査法ならびに検出法の確立、伝播経路の解明、食品や環境での汚染実態調査、予防法の確立等を実施した。ノロウイルスの流行疫学、遺伝子学的解析から、2006/2007 年の流行を凌駕する流行が 2007/2008 年に見られた。流行したノロウイルスの遺伝子型は GII/4 が主流であった。食材からのノロウイルスの遺伝子検出方法が新たに考案された。カキには α -アミラーゼ添加による前処理が効率よくノロウイルス遺伝子を検出でき、また食材からはパンソルビン-抗ノロウイルス抗体-ノロウイルス複合体の形成と、それからのノロウイルス遺伝子の検出が効果的であった。嘔吐物による事例では、嘔吐物の的確な処理が感染拡大防止に極めて重要であることが示唆された。A 型肝炎ウイルスでは RT-LAMP 法が確立され、臨床検体からの遺伝子検出が効率よく行なえるようになった。E 型肝炎では増殖のために培養細胞系が確立できた。また、ブタにおける伝播状況が明らかになった。サポウイルスはノロウイルス同様、カキに蓄積する可能性が示された。さらに、シジミには実に多くの腸管感染ウイルスが蓄積していることが明らかになった。

分担研究者		皆川 洋子	愛知県衛生研究所
田中 智之	堺市衛生研究所	山下 照夫	同上
小林 慎一	愛知県衛生研究所	川口まり子	同上
恒光 裕	動物衛生研究所	池田 秀利	動物衛生研究所
野田 衛	国立医薬品食品衛生研究所	宮崎 綾子	同上
		鈴木 孝子	同上
米山 徹夫	国立感染症研究所	山田 学	同上
李 天成	同上	服部奈千子	同上
岡 智一郎	同上	吉澄 志磨	北海道立衛生研究所
グラント・ハンスマン	同上	石田勢津子	同上
白土 東子	同上	三好 正浩	同上
		奥井 登代	同上
協力研究者		三上 稔之	青森県環境保健センター
内野 清子	堺市衛生研究所	石川 和子	同上
三好 龍也	同上	熊谷 邦彦	同上
吉田 永祥	同上	植木 洋	宮城県保健環境センター
中村 武	同上	庄司 美加	同上
松尾 光子	同上	斎藤 博之	秋田県健康環境センター

高橋 朱実	岩手県環境保健研究セン	入谷 展弘	大阪市立環境科学研究所
ター		吉田 徹也	長野県環境保全研究所
高橋 雅輝	同上	白石 崇	同上
蛇口 哲夫	同上	小林 正人	同上
滝澤 剛則	富山県衛生研究所	粕尾しず子	同上
中村 一哉	同上	畔上 由佳	同上
小原 真弓	同上	田村 務	新潟県保健環境科学研究
長谷川澄代	同上	所	
岩井 雅恵	同上	篠崎 邦子	千葉県衛生研究所
堀元 栄詞	同上	谷口 力夫	杉並保健所
倉田 毅	同上	小暮 実	中央区保健所
東方 美保	福井県衛生環境研究セン	岩切 章	宮崎県衛生環境研究所
ター		三浦 美穂	同上
北元 憲利	兵庫県立大学	山本 正悟	同上
飯塚 節子	島根県保健環境科学研究	林 志直	東京都健康安全研究セン
所		ター	
小村 珠喜	同上	清原 知子	国立感染症研究所
田原 研司	同上	島崎 典子	同上
福田 伸治	広島県立総合技術研究所	下池 貴志	同上
保健環境センター		劉 蘭軍	同上
近藤 玲子	愛媛県立衛生環境研究所	西尾 治	同上
大塚 有加	同上		
市川 高子	同上		
大瀬戸光明	同上		
船津丸貞幸	佐賀県衛生薬業センター		
増本 久人	同上		
坂本 晃子	同上		
平野 敬之	同上		
松岡由美子	熊本市環境総合研究所		
森田 美加	同上		
川本 大輔	福岡市保健環境研究所		
小河 正雄	大分県衛生環境研究セン		
ター			
田代 潔子	同上		
長岡 健朗	同上		
藤原 慶一	千葉大学		
柴田伸一郎	名古屋市衛生研究所		
大内 良美	滋賀県衛生研究所		
長谷川嘉子	同上		
岡本 玲子	山口県環境保健センター		
有田 知子	日本スポーツ振興センタ		
ー			

A. 研究目的

食品由来ウイルス感染症は国民の食生活にとって益々脅威となってきた。ノロウイルス (NoV) による集団食中毒や A 型肝炎ウイルス (HAV) による集団急性肝炎、野生動物の生肉喫食による劇症 E 型肝炎など、ウイルスに汚染された食品が原因となった疾病が的確に捉えられるようになり、事件数や患者数も正確に把握されるようになってきた。発生状況をつぶさに把握し、その結果を国民、行政機関、および医療関係者に迅速かつ的確に提供することは、上記の感染症を制圧する上で重要な施策のひとつである。これらの感染症の制御を困難にしている最大の理由は、現在ある検出法の検出限界を超えた、極めて微量のウイルス量で感染が成立することである。このため、二枚貝とノロウイルス、二枚貝と A 型肝炎ウイルスの組合せ以外は原因食品や物質を特定することが極めて困難な状況にある。食品由来ウイルス感染症においては、上記の三つのウイルスが緊急度、

重要度の点で突出している。また、研究の進展とともに、サポウイルス (SaV) が新たな脅威として登場してきた。いずれも RNA を遺伝子にもつウイルスであるが、これらを効率よく、かつ厳密に区別する必要もある。また、これらの感染症の制圧には、原因となった食品が汚染されるまでのウイルスの伝播経路を明らかにする必要はある。

本研究では以下を研究目的とする。

(1) 原因食品からのウイルス検出では遺伝子増幅による定量法を確立するとともに、免疫学的手法を用いたウイルス濃縮法を導入し、検出効率の向上を目指す。

(2) 食品や環境からのウイルス検出を行うことによって汚染実態調査を行う。

(3) 個々のウイルスについてその発症ウイルス量を把握するため感染実験モデルを構築する。

(4) マーカー遺伝子を人工的に導入した組換え粒子を作製し、ウイルス不活化の条件を検討する。

(5) 以上の結果を総合的に解析し予防に必要な条件を整理し、予防法を確立する。

B. 研究方法

(1) A 型肝炎ウイルス (HAV)

RT-LAMP kit (栄研化学) を用いて比濁法によるリアルタイム検出を行った。

(2) E 型肝炎ウイルス (HEV)

E 型肝炎検査マニュアル (地方衛生研究所全国協議会、国立感染症研究所監修) に従い、抗体検出 ELISA および RT-PCR による HEV 遺伝子増幅を行なった。

(3) ノロウイルス (NoV)

発生の実態、感染原因 (要因)、NoV の遺伝子学的特徴等について各地衛研の感染事例を中心に汚染実態調査を行なった。イムノクロマト (IC)、イムノ磁気ビーズ (IMB) 等を用いて食品からのウイルス検出を検討した。

(4) サポウイルス (SaV)

NoV 同様、各地衛研の感染事例を中心に汚染実態調査を行なった。

(倫理面への配慮)

本研究にあたっては、試料提供者、その家族の人権、尊厳、利益が保護されるよう十分に配慮した。具体的には、各研究実施機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、また提供試料、個人情報厳格に管理、保存した。そのデータについて個人が特定されないよう配慮した。動物実験に関しては「動物の保護及び管理に関する法律」(昭和 48 年法律第 105 号) 及び「実験動物の飼育及び保管に関する基準」(昭和 55 年総理府公示第 6 号) の法律及び基準の他、「大学等における実験動物について」(文部省国際学術局長通知、文学情大 141 号) の通知を踏まえつつ、動物実験が有効かつ適切に行われるよう配慮した。また感染研における動物実験指針に基づき、用いる動物の数は最小限とし、採血時には麻酔を施し動物愛護の精神のもとに実験を行った。

C. 研究結果

(1) A 型肝炎ウイルス (HAV)

[LAMP 法による遺伝子増幅の有用性の検討]

IA 型の HAV031 細胞馴化株から抽出したウイルス RNA を HAV RT-LAMP 法の検量線の作成に使用した。Roche の HAV 定量キットのスタンダードを参照して、RT-LAMP 法の検量線を作成した。RT-LAMP 法の定量域は 100 コピー/5 μ l 以上で Roche の HAV 定量キットとほぼ同等であった。(米山徹夫 分担研究報告書)

[リアルタイム PCR 法による定量法の確立]

A 型肝炎患者からの 42 検体を使って、HAV RT-LAMP 法の HAV RNA 検出効率を調べた。市販の LightCycler を使用したリアルタイム RT-PCR 法と RT-LAMP 法は、ほぼ同等の成績が得られた。(米山徹夫 分担研究報告書)

(2) E 型肝炎ウイルス (HEV)

[動物における E 型肝炎の抗体調査、PCR によるウイルス遺伝子の検出]

18 養豚場より計 24 回、肉豚発育ステージ別血清を採取して HEV 抗体検査を実施した。75%で 120 日齢までに血清中の HEV 抗体価の上昇が確認された。一方、25%では HEV 抗体価の上昇は 150-180 日齢まで確認されないか、150 日齢で初めて確認された。糞便、血清について RT-PCR 法により HEV 遺伝子検査を実施したが、いずれの血清からも HEV 遺伝子は検出されなかった。一方、糞便中では HEV 抗体価の上昇直前ならびに上昇直後の一部材料で HEV 遺伝子が検出された。8 農場より計 14 回、母豚血清を採取して HEV 抗体検査を実施した結果、母豚産歴別の HEV 抗体価は採材時間で一定の傾向は認められなかった。(恒光裕 分担研究報告書)

[検出された E 型肝炎ウイルス遺伝子の解析]
継続中

[培養細胞による増殖の確立]

ブタから分離した遺伝子型 3 (G3) に属する HEV 株を PLC/PRF/5 細胞に接種し、異なる培養条件下でのウイルス増殖を経時的に培養上清中の HEV RNA, HEV 抗原を RT-PCR, ELISA 法にて測定し、HEV の増殖できる最適な培養条件を検討した。その結果、上清に 5 日目から HEV-RNA が検出され、32 日目から HEV 構造蛋白が検出された。その後、HEV 構造蛋白および HEV-RNA はコンスタントに培養上清から検出され、接種後 10 ヶ月が経った時点でも依然高いレベルを維持していた。(李 天成 分担研究報告書)

(3) ノロウイルス (NoV)

[食品、環境における NoV の汚染実態調査]

・GI NoV は下水検体から調査期間を通じて高頻度に検出されたが、感染性胃腸炎患者や集団発生事例からの検出頻度は低いウイルスであった。GII NoV は下水検体からヒトの流行時期とほぼ一致して検出された。(小林慎一 分担研究報告書)

・牡蠣が原因と疑われた食中毒事例 11 事例、71 検体について RT-PCR 法もしくは

nested RT-PCR 法によって NoV, SaV の検出を行った。その結果、11 事例中すべてで NoV が検出された。3 事例では NoV に加えて SaV も検出された。(岡 智一郎 分担研究報告書)

・市販のシジミ 57 パックについて NoV、アイチウイルス、ロタウイルス、腸管アデノウイルス、HAV、アストロウイルスの遺伝子検出を行なった。NoV は 57%から、アイチウイルスは 33%から、ロタウイルスは 42%から、腸管アデノウイルスは 52%から、HAV は 2%から検出された。アストロウイルスは検出されなかった。(グラント・ハンスマン 分担研究報告書)

・流行疫学、遺伝子学的解析では、地域的に 2006/2007 年の流行を凌駕する流行が 2007/2008 年に見られた。遺伝子型の主流は昨シーズン同様 GII/4 であった。(田中智之 協力研究報告書 I)

・嘔吐物による事例では、嘔吐物の的確な処理が感染拡大防止に極めて重要であることが示唆されるとともに、その疫学的、ウイルス学的様相には不明な部分が多く、具体的かつ効果的な予防対策を明示するためには、今後も詳細に調査・研究を継続する必要がある。(野田 衛 協力研究報告書 II)

[調理従事者の不顕性感染の実態調査]

継続中

[イムノクロマト、イムノ磁気ビーズを用いた食品からのウイルス検出]

IC 法で食品中の NoV を検出するには、少なくとも 10^6 copy/ml 以上のウイルス量が必要であり、検出には無理があることが判明した。(田中智之 分担研究報告書)
マグロ赤身表面にノロウイルス GII/4 を約 10^6 コピー数添加し 2 時間放置乾燥した検体に 18 種類の試験液を加え軽く混和し、一夜放置後の試験液へのウイルス回収量を調べた。最も回収率が高かった試験液は SDS Tris-Glycine、次いで 0.1% SDS 加 PBS (-) で、100%以上の回収率を示

し、対照とした PBS (-) は約 60% の回収率であった。高い回収率を示した試験液では、回収率が経時的に増加した。(野田衛 分担研究報告書)

食材から NoV の遺伝子検出方法が新たに考案された。カキには α -アミラーゼ添加による前処理が効率よく NoV 遺伝子を検出でき、また食材からはパンソルビン-抗 NoV 抗体-NoV 複合体の形成とそれからの NoV 遺伝子の検出が効果的であった。(田中智之 協力研究報告書 I)

H type 1、H type 2、H type 3 のいずれかと結合した GI 3 株、GII 6 株について、その前駆体、H type 1 precursor、H type 2 precursor、H type 3 precursor との結合を解析した結果、9 株とも前駆体とは結合しなかった。また、9 株中 7 株は、タイプ毎に異なる結合強度を示し、これら糖鎖の構造の差を認識していた。(白土東子 分担研究報告書)

(4) サボウイルス (SaV)

[食品の汚染実態調査]

SaV は下水検体からヒトの流行時期とほぼ一致して検出された。(小林慎一 分担研究報告書)

牡蠣が原因と疑われた食中毒事例 11 事例、のうち、3 事例では NoV に加えて SaV も検出された。(岡 智一郎 分担研究報告書)

[調理従事者の不顕性感染の実態調査]

・継続中

D. 考察

(1) A 型肝炎ウイルス (HAV)

患者検体からの検出率はほぼ同等なのに RT-LAMP 法では、市販のリアルタイム RT-PCR 法に比べ、20-100 倍コピー数が高く算出される。理由は不明であるが、RT-LAMP 法では検体中の HAV が低濃度 (100 コピー/ $5\mu\text{l}$) から中濃度 (10,000 コピー/ $5\mu\text{l}$) のところで、実際より高くコピー数が算出されてしまうことが観察

された。その他に、検体により糞便検体中のインヒビターが、市販のリアルタイム RT-PCR 法の検出系に影響することがあるのも一因のようである。HAV の RT-LAMP 法は検出感度には問題がないが、定量性に問題が残る。

(2) E 型肝炎ウイルス (HEV)

・肥育末期に HEV 感染が起きている豚において HEV 遺伝子は糞便から検出されたが、血清からは全く検出されなかった。このことから、過去の報告と同様に市販の豚肉中に HEV が含まれる危険性は低いと推測された。一方、糞便中から検出された HEV 遺伝子は肝臓で生成された胆汁由来と考えられ、このことは豚レバーから時に HEV 遺伝子が検出されたとする過去の成績を支持する。

・HEV が増殖できる培養細胞系を確立したことから、ウイルス増殖、複製のメカニズムの解明に新たな道が開かれた。又、これによって HEV の不活化条件、消毒薬の評価、ワクチン効果、さらに治療薬のスクリーニング等を *in vitro* で容易に検討することが可能になり、食品等からのウイルス除去に有力な科学根拠を提供できるようになった。

(3) ノロウイルス (NoV)

・下水からの GII 型検出は感染性胃腸炎の流行時期とよく一致していた。しかし、下水のウイルス解析からはヒトの間では多様な遺伝子型の GI が地域流行していることが推察されたが、臨床検体からの検出頻度が低い。定量的な解析が必要である。

・添加回収実験を NoV 食中毒の原因食品となっている寿司の内、一般的なマグロ赤身を使用して添加回収実験を行った。この結果が他の食品でも同様に認められるか今後詳細に検討する必要がある。また、食品以外の環境材料の拭き取り検査に際しても、環境に付着した NoV をより効率的に回収し、検査に供するためには、採取液の選択が重要な要因になると考えられる。それらの検査にもこれらの試験液が適応できる可能性があり、同様に検討を加える必要がある。

(4) サボウイルス (SaV)

・臨床検体からは多様な遺伝子型の SaV が検出される傾向にあるが、下水検体からは GI 型のみが検出される。NoV 同様、定量的な解析が必要である。

・生牡蠣による食中毒事例で NoV だけでなく SaV が検出される事例が存在することが初めて示された。本研究では牡蠣そのものからの NoV、SaV 核酸の検出は行っていないが、カキには NoV だけでなく SaV も蓄積されている可能性が示唆された。

(5) その他

・市販のシジミは極めて多種類の腸管感染ウイルスで汚染を受けていた。カキと異なり通常生食することはない貝であるが、今後リスク評価が必要になるかもしれない。

・NoV の宿主特異性も血液型抗原上のガラクトースと N アセチルグルコサミン間の linkage が $\beta 1-3$ か $\beta 1-4$ によって決定されることを示唆する結果を得た。NoV は遺伝学的、血清学的に多様であるため、ワクチンによる予防は困難であるが、レセプターへの結合を阻害する薬剤による予防は効果が期待できる。

E. 結論

・定量性には問題性があるが、HAV RT-LAMP 法はフィールドでの迅速検査に有効である

・豚での HEV の主要な感染月齢は 2-3 ヶ月齢であるが、肥育末期に HEV 感染が起きている農場が存在した。同一農場においても HEV の感染月齢は時期により異なる場合があった。市販の豚肉中に HEV が含まれる危険性は低いと考えられた。母豚において HEV の再感染あるいは再暴露が時におこっていた。

・HEV の培養細胞による増殖系を確立した。

・下水中の NoV や SaV の解析には定量的検査法を導入する必要がある。

・食品等からのウイルス検出には SDS を含む洗浄液を使用することにより、回収率が向上した。

・カキには NoV だけでなく SaV も蓄積されている可能性があった。

・カキには、 α -アミラーゼ添加による前処理

を用いた検出方法が有効であった。

・食材ではパンソルピン・トラップ法を NV 検出方法として普遍化し、食の安心・安全に貢献できる。

・嘔吐物の的確な処理が感染拡大防止に極めて重要であることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Li TC, Miyamura T, Takeda N, 2007. Detection of hepatitis e virus RNA from the bivalve yamato-shijimi (*corbicula japonica*) in Japan. *Am J Trop Med Hyg* 76: 170-2

Mochizuki M, Ouchi A, Kawakami K, Ishida T, Li TC, Takeda N, Ikeda H, Tsunemitsu H, 2006. Epidemiological study of hepatitis E virus infection of dogs and cats in Japan. *Vet Rec* 159: 853-4.

Serological Evidence for Hepatitis E Virus Infection in Laboratory Monkeys and Pigs in Japan. 2008. Hiroshi Yamamoto, Li TC, Chihiro Koshimoto, Kaoru Itoh, Nobumoto Miyashita, Jiro Arikawa, Kenichi Yagami, Masahide Asano, Hideo Tezuka, Noboru Suzuki, Tsutomu Kurosawa, Tosiyuki Shibahara, Masato Furuya, Shiro Mori, Hiroshi Satoh, Kazuki Ohsawa, Kentaru Ibuki, Sung-IL Lee, Masakazu Kita, Naokazu Takeda. *Exp. Animals. In press*

Hansman GS, Saito H, Shibata C, Ishizuka S, Oseto M, Oka T, Takeda N. Outbreak of gastroenteritis due to sapovirus. *J Clin Microbiol.* 45 (4):1347-9, 2007.

Hansman GS, Oka T, Katayama K, Takeda N. Human sapoviruses: genetic diversity, recombination, and classification. *Rev Med Virol.* 17 (2):133-41, 2007.

Hansman GS, Sano D, Ueki Y, Imai T, Oka T, Katayama K, Takeda N, Omura T. Sapovirus

- in water, Japan. Emerging Infectious Diseases. 13(1): 133-5., 2007.
- Oka T, Yamamoto M, Yokoyama M, Ogawa S, Hansman GS, Katayama K, Miyashita K, Takagi H, Tohya Y, Sato H, Takeda N. Highly conserved configuration of catalytic amino acid residues among calicivirus-encoded proteases. J Virol. 81(13): 6798-806., 2007.
- Hansman GS, Oka T, Okamoto R, Nishida T, Toda S, Noda M, Sano D, Ueki Y, Imai T, Omura T, Nishio O, Kimura H, Takeda N. Human sapovirus in clams, Japan. Emerg Infect Dis. 13(4): 620-2., 2007.
- Hansman GS, Ishida S, Yoshizumi S, Miyoshi M, Ikeda T, Oka T, Takeda N. Recombinant sapovirus gastroenteritis, Japan. 13(5): 786-8., 2007.
- Hansman GS, Oka T, Sakon N, Takeda N. Antigenic diversity of human sapoviruses. Emerg Infect Dis. 13(10): 1519-25., 2007.
- Hansman GS, Oka T, Li TC, Nishio O, Noda M, Takeda N. Detection of human enteric viruses in Japanese clams. J. Food. Protect. 2008 in press.
- Shirato-Horikoshi H., Ogawa S., Wakita T., Takeda N., Hansman GS. Binding activity of norovirus and sapovirus to histo-blood group antigens. Archives of Virology. 152(3): 457-461, 2007
- Shirato-Horikoshi H. Histo-blood group antigens and norovirus. Glycoforum. <http://www.glycoforum.gr.jp/>
- 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、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ーノロウイルス 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
- 白土東子、武田直和: ノロウイルスと血液型抗原. ウイルス 57(2): 181-190, 2007. 日本ウイルス学会 雑誌ウイルス編集委員会
- ## 2. 学会発表
- Tomoichiro Oka, Grant S. Hansman, Setsuko Ishida, Hiroyuki Saito, Shima Yoshizumi, Masahiro Miyoshi, Tetsuya Ikeda, Chihiro Shibata, Shizuko Ishizuka, and Naokazu Takeda. Viral loads of sapovirus 第8回プラスストランドRNAウイルス国際シンポジウム、ワシントン、アメリカ 2007年5月26-30日.
- Tomoichiro Oka, Tomoko Arita-Nishida, Mamoru Noda, Daisuke Sano, You Ueki, Takahiro Imai, Tatsuo Omura, Osamu Nishio, Hirokazu Kimura, Naokazu Takeda, and Grant S. Hansman. Detection of Human Sapovirus from clams in brackish water 第14回水中の健康関連微生物国際シンポジウム、東京、2007年9月9-15日
- Haruko Shirato and Naokazu Takeda: Interaction between norovirus and histo-blood group antigens, The 2nd Thailand-Japan Joint Forum on Infectious Diseases, Bangkok, Thailand, 2007. 10
- 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
- 熊谷邦彦、石川和子、三上俊之、阿部幸一、畑山一郎、田中智之、武田直和 市販生力キの中腸腺及びパック内浮遊水からのノロウイルス検出、第61回日本細菌学会東北支部総会、仙台市、2007. 8
- 小林慎一、川口まり子、長谷川晶子、伊藤 雅、山下照夫、武田直和、皆川洋子: 愛知県下

- 流入下水からのノロウイルスとサポウイルスの検出状況、第55回日本ウイルス学会学術集会、札幌市、2007年。
- 李天成, 宮村達男, 脇田隆字, 武田直和, 2007. 10. シジミからのE型肝炎ウイルス遺伝子の検出。第55回日本ウイルス学会学術集会。札幌。
- 李天成, 宮村達男, 脇田隆字, 武田直和, 2007. 10. キメラマウスにおけるE型肝炎ウイルスの複製。第55回日本ウイルス学会学術集会。札幌。
- 加藤花名子, 佐藤幸代, 宮崎綾子, 吉井雅晃, 土屋公幸, 仲谷淳, 鈴木和男, 樹金森弘, 李天成, 武田直和, 恒光裕, 池田秀利, 2007. 9. 野生動物における抗E型肝炎ウイルス抗体の保有状況調査。第144回日本獣医学会学術集会。江別市
- 原田誠也, 岡田峰幸, 岡智一郎, Grant S. Hansman, 武田直和 サポウイルスによる乳幼児散発性胃腸炎の分子疫学解析- 熊本県- 第55回日本ウイルス学会、札幌、2007年10月21-23日。
- 小澤一弘, Hansman S. Grant, 岡智一郎, 片山和彦, 武田直和 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、札幌、2007年10月21-23日。
- 石田勢津子, 吉澄志磨, 三好正浩, 奥井登代, 岡野素彦, Grant S. Hansman, 岡智一郎, 武田直和サポウイルスによる胃腸炎集団発生事例- 北海道- 第55回日本ウイルス学会、札幌、2007年10月21-23日。
- 斎藤博之, Grant S. Hansman, 岡智一郎, 武田直和 保育園で流行したサポウイルスの解析第55回日本ウイルス学会、札幌、2007年10月21-23日。
- Grant S. Hansman, Tomoichiro Oka, and Naokazu Takeda. Antigenic Diversity of Human Sapoviruses. 第55回日本ウイルス学会、札幌、2007年10月21-23日。
- 宮下佳奈, 岡智一郎, Hansman S. Grant, 山本真民, 片山和彦, 小川智子, 脇田隆字, 武田直和 哺乳動物細胞を用いたサポウイルス様粒子の発現 第55回日本ウイルス学会、札幌、2007年10月21-23日。
- 山本真民, 岡智一郎, Hansman S. Grant, 宮下佳奈, 片山和彦, 小川智子, 脇田隆字, 武田直和 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、札幌、2007年10月21-23日。
- 岡智一郎, 横山勝, 宮下佳奈, 山本真民, Hansman S. Grant, 片山和彦, 小川智子, 脇田隆字, 佐藤裕徳, 武田直和 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、札幌、2007年10月21-23日。
- 横山勝, 岡智一郎, 山本真民, 宮下佳奈, Hansman S. Grant, 片山和彦, 小川智子, 神田忠仁, 佐藤裕徳, 武田直和 サポウイルスプロテアーゼ/ORF1ポリプロテイン複合体の構造解析 第55回日本ウイルス学会、札幌、2007年10月21-23日。
- Oka T, Yokoyama M, Yamamoto M, Miyashita K, Hansman GS, Katayama K, Takagi H, Tohya H, Sato H, and Takeda N. Structural and functional analysis of the calicivirus-encoded 3C-like proteases Third International Calicivirus Conference 2007年11月10-13日、メキシコ(カンクン)
- 岡智一郎, 山本真民, 宮下佳奈, ハンスマン グラント, 片山和彦, 脇田隆字, 武田直和 ネコカリシウイルスプロテアーゼのトランス切断活性の検討 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会(合同大会) 2007. 12/11-15 横浜
- 岡智一郎, 片山和彦, 宮下佳奈, 山本真民, Hansman S. Grant, 脇田隆字, 武田直和 サポウイルスプロテアーゼのトランス切断活性 日本薬学会第128年会 2008. 3. 26-28 横浜
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得 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

食品中のウイルスの制御に関する研究

平成 19 年度 分担研究報告書

田中 智之
小林 慎一
恒光 裕
野田 衛
米山 徹夫
李 天成
岡 智一郎
グラント・ハンスマン
白土 東子

平成 20 (2008) 年 4 月

平成 19 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

イムノクロマトグラフ法で食品中のノロウイルスは検出できるか

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、中村 武
(堺市衛生研究所)

研究要旨:

開発されたイムノクロマトグラフ (Immunochromatography, 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。この IC 法を用いて食品中のノロウイルス (NV) の検出を試みた。

IC kit 検出感度は Genogroup II, Genotype 4 (GII/4) ノロウイルス (NV) を含んだ糞便材料を用いた場合、 1.4×10^4 copy /g 以上であった。

トマトジュースおよびオレンジジュースに添加した GI/4 の検出コピー数は 7.5×10^6 copy/ であった。

以上の結果から、IC 法で食品中の NV を検出するには、少なくとも 10^6 copy/ml 以上のウイルス量が必要であり、現実的には NV 検出方法には適していないことが判明した。しかし、調理場での吐物現場ふき取り検査などには、使用できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

平成 19 年度に、当市における NV 関連食中毒事例について、遺伝子型の判明した 12 例について、感染様式、調理従業者の関与、遺伝子型について、疫学的調査研究を継続した。

一方、食品由来の NV 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。後者では開発した IC 法は検出感度、保有ウイルス量から診断できる可能性が

高い。IC 法は簡便で測定時間が僅か 15 分で診断されるという優れた利点がある。そこで、この IC 法を食材中の NV 検出に応用できないかを検討した。

B. 研究方法

食中毒感染事例の NV 遺伝子検出、遺伝子型の決定は、これまで行なっている方法に従った。

一方、食中毒事例から得られた NV 陽性 (GII/4) 糞便検体を 10^7 copy/ml に調整した。市販のトマトジュース、オ

レンジジュース 10ml、それぞれ 3 検体に上述の NV 検体を混和した。室温に 30 分静置後、8,000rpm, 20 min. 遠沈した。その上清をさらに 40,000 rpm, 60 min. 遠沈した。Pellet に添付の sample buffer、300ul を加え IC 法で検出を試みた。

C. 研究結果

疫学的調査研究の結果を表 1 に示す。12 事例中 8 事例 (67%) は GII/4 であり、昨年度同様に NV の主流流行株であった。前年度予測した GII/8 は 2 事例であった。そのうち一例には比較的多数の有症者がみられた。2 事例に混合感染がみられ、GII/4+GI/1, GII/4+GI/4 であった。GII/4 主流株に対し、それぞれ一名の頻度であった。昨年度に続いて、今年度も調理従事者の食中毒への関与は高いことが判明した。NV 検出率は患者 60/70 (85.7%) に対し、調理従事者 (従業員) 14/52 (26.9%) であった。

一方、トマトジュース、オレンジジュースに混和した NV は IC 法にて 2 検体から検出された。この陽性検体の NV 量は 7.5×10^6 copy/ml であった。

D. 考察

NV 流行疫学では、昨年度ほどの規模ではないが、第 49 週から流行が認められた。流行の主流株は GII/4 で、GII/8 も 2 事例見られた。その内、1 事例は中規模の患者発生状況であった。流行の主流 NV 株は、しばらくは GII/4 と考えられるが変異のしやすい

株である点などから、今後の変異株出現に注目し、十分にサーベイをしなければいけないと考える。

一方、IC 法を用いて食品中の NV を検出する方法は、期待する以上の成績は得られなかった。その原因は、IC 法の検出感度、食品中に存在する夾雑物の影響、さらに pH や脂質の影響が考えられる。これらの前処理が上手く行えたと仮定しても、食品中のウイルス量が検出感度以上に混入していることは予測し難い。

IC 法による糞便中のウイルス量の検出感度は、 $1.85 \times 10^5 \sim 7.29 \times 10^7$ copy / ml である点からも、今後は IC 法の感度を高めない限り、この方面での検出系の構築は困難である。

しかし、IC 法は 15 分で診断可能な、極めて簡便な方法である。臨床面では、早期の便検体が得られれば、80%の感度で NV の診断ができる。この利点から、食品中から NV 遺伝子の検出系の再構築を試みることは決して無駄ではないと考える。また、調理現場等でのふき取りなどによる汚染状況のチェックも視野に入れた再構築を試みるべきであると考ええる。

E. 健康危機情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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
- 2) 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
- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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
- 6) Naotaka Ishiguro, Yasuo Inoshima, Kazuo Suzuki, Tomoyuki Tanaka, Tatsuya Miyoshi
Construction of three-year genetic profile of Japanese wild boars in Wakayama prefecture, to estimate gene flow from crossbred Inobuta into wild boar populations (Mammal Study 投稿中)
1. 学会発表
- 1) 福田伸治、三好龍也、内野清子、中村 武、吉田永祥、田中智之
28 回衛生微生物技術協議会第 8 研究 岡山市 2007 年 7 月
- 2) 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総会 ランチオンセミナー
2007 年 9 月 東京都
- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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
- 6) 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
- 7) 熊谷邦彦、石川和子、三上俊之、阿部幸一、畑山一郎、田中智之、武田直和：市販生カキの中腸腺及

びパック内浮遊水からのノロウイルス検出、第 61 回日本細菌学会東北支部総会、仙台市、2007. 8

G. 知的財産権の出願、登録状況申請中

表 1. 平成 19 年度 遺伝子型が判明したノロウイルス食中毒事例 (堺市)

事例	検体受付日	種別	有症者数	検査数	陽性数	タイプ	検出率	重複感染
1	4/20~24	飲食店	9	11	5	GⅡ/4	患者 4/6、従業員 1/5	
2	5/5~7	飲食店	5	5	2	GⅡ/13	患者 2/3、従業員 0/2	
3	5/15~17	飲食店	36	16	14	GⅡ/13	患者 13/15、従業員 1/1	
4	11/22~23	給食	64	10	8	GⅡ/4	患者 8/8、従業員 0/2	GI/1 (1名)
5	12/11~14	飲食店	31	12	10	GⅡ/4	患者 10/12	GI/4 (1名)
6	12/18~20	飲食店	不明	25	14	GⅡ/4	患者 11/12、従業員 3/13	
7	12/20~21	飲食店	13	10	4	GⅡ/4	従業員 4/10	
8	1/17	飲食店	8	11	8	GⅡ/4	患者 8/8、従業員 0/3	
9	2/1	市販釜飯 の素	1	2	2	GⅡ/4	同一患者の吐物 1、便 1	
10	2/5	飲食店	7	4	4	GⅠ/8		(大阪府からの依頼)
11	2/17	飲食店	7	6	1	GⅠ/4		ウエルシュ菌食中毒
12	2/26~29	飲食店	47	21	8	GⅠ/8	患者 3/5、従業員 5/16	

検出率 合計 患者 60/70 (85.7%)
従業員 14/52 (26.9%)