

表1 材料内訳

材料	協力機関	採取時期(年)	検体数
糞便	名古屋市	2006	9
糞便	滋賀県	2006	16
糞便	その他A	2004	1
小計			26
血清	千葉大	不明	12
血清	その他B	2002	4
小計			16
総計			42

表2 定量的PCR法とLAMP法の*検出感度の比較

糞便検体 総数: 26		PCR法	
		陽性	陰性
LAMP法	陽性	25	0
	陰性	**1	0

血清検体 総数: 16		PCR法	
		陽性	陰性
LAMP法	陽性	13	**2
	陰性	**1	0

*:それぞれ2回の試験を行い、1回でも検出できた検体を陽性とした。

** : 微陽性

表3 LAMP法とPCR法で算出された*HAVコピ一数の比較

	RT-PCR (Roche)	RT-LAMP	LAMP/PCR
糞便(**n=24)	2.6	4.7	2.1
血清(**n=5)	1.8	3.1	1.3

*: 5 μ lあたりの対数表示の平均値

** : LAMP法で定量値(100コピ一/5 μ l)以上の検体

分担研究報告書

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

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 E 型肝炎ウイルス（HEV）は増殖のための確実な細胞培養系が未だに樹立されていないウイルスである。細胞培養系はウイルスの複製、増殖、感染のメカニズムの解明には欠かせない手法である。我々は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。

協力研究者 劉 蘭軍（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（Hepatitis E virus; 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。E 型肝炎の一つの特徴は感染妊婦の死亡率が高いことで、実に 20% に達するという報告もある。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、ウイルス増殖、複製機序は未だに明らかにされず、ワクチン開発のための基盤的情報が不足している。今回我々はブタから分離した遺伝子型 3 (G3) HEV をヒト肝癌細胞 PLC/PRF/5 に接種し、ウイルスの複製、増殖等の有無を観察し、さらに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。

B. 研究方法

HEV 感染ブタ由来の肝臓組織をすりつぶし、PBS (-) で 10% 乳剤を作製した。ELISA 法および RT-PCR 法によってウイルス抗原と遺伝子を確認した。1 ml の肝細胞乳剤を PLC/PRF/5 細胞に接種し、培養上清を二、三日置きに採取した。細胞培養上清のウイルス抗原、およびウイルス遺伝子を測定し、培養細胞で増殖するかどうかを評価した。さらに 4 種類異なる培地組成、培地 199、培地 199+Mg⁺、培地 199+培地 DME、および培地 199+培地 DMEM+MgCl₂ について 37℃ と 36℃ で培養し、ウイルスの増殖効率を比較した。

C. 研究結果および考察

G3 HEV を感染した PLC/PRF/5 細胞の上清に 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る。また、培養上清から分離したウイルスのアミノ酸配列は感染出発材料から分離したウイルスのアミノ酸配列と一致し、培養細胞での複製、増殖による変異が見られなかった。

蛍光抗体を用いた免疫染色法では HEV 構造蛋白が細胞質に分布していることが示された。さらに構造蛋白をウェスタンブロット法で解析した結果、糖鎖修飾されることも示唆された。糖鎖修飾の意義、およびそのメカニズムをさらに解析する必要がある。ウイルス増殖の至適条件は培地 199 に 30mM MgCl₂ を加え 36℃ で培養することであった。

D. 結論

HEV が増殖できる培養細胞系を確立した。培養細胞の樹立によって、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る。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。

F. 研究発表

1. 学会発表

1. 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.
2. 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.
3. 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

2. 論文発表

- (1) Matsuura Y, Suzuki M, Yoshimatsu K,

Arikawa J, Takashima I, Yokoyama M, Igota H, Yamauchi K, Ishida S, Fukui D, Bando G, Kosuge M, Tsunemitsu H, Koshimoto C, Sakae K, Chikahira M, Ogawa S, Miyamura T, Takeda N, Li TC, 2007. Prevalence of antibody to hepatitis E virus among wild sika deer, *Cervus nippon*, in Japan. *Arch Virol* 152: 1375-81.

- (2) 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

- (3) 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.

- (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, Tosiya Shibahara, Masato Furuya, Shiro Mori, Hiroshi Satoh, Kazuki Ohsawa, Kentaru Ibuki, Sung-IL Lee, Masakazu Kita, Naokazu Takeda. *Exp. Animals. In press*

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)

「食品中のウイルスの制御に関する研究」

分担研究報告書

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

分担研究者 岡 智一郎 国立感染症研究所 ウイルス第2部

研究協力者

Hansman S. Grant 国立感染症研究所 ウイルス第2部

岡本 玲子 山口県環境保健センター 保健科学部

有田 知子 独立行政法人日本スポーツ振興センター

健康安全部 衛生管理室

野田 衛 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

研究要旨

ノロウイルス(Norovirus; NoV)、サポウイルス(Sapovirus; SaV)は、ヒト感染性胃腸炎の原因ウイルスとして公衆衛生上重要なウイルスである。近年、急性胃腸炎患者からの SaV 検出数が増加しているが、その感染経路はいまだ不明な点が多い。そこで、本研究では食材を通じた SaV 感染の可能性を探るため、カキが原因と疑われた食中毒事例患者、調理従事者糞便中の下痢症ウイルスの検出を行い、NoV だけでなく SaV が陽性となる事例が存在することを明らかにした。

A. 研究目的

ノロウイルス(Norovirus; NoV) およびサポウイルス(Sapovirus; SaV)はカリシウイルス科に属する小型の球形ウイルスで、ヒトに急性胃腸炎を引き起こす。これらのウイルスのゲノムはいずれも約7,500塩基からなるプラス1本鎖のRNAで、構造遺伝子領域の塩基配列に基づき NoV は主に2つの genogroup (GI と GII)に、SaV は5つの genogroup (GI-GV)に分類される。ヒト由来の NoV、SaV 株は細胞培養系や実験動物系が確立されていないため、NoV、SaV の検出には電

子顕微鏡観察もしくは nested reverse transcriptase polymerase chain reaction (nested RT-PCR)法、real-time RT-PCR 法が主に用いられている。

SaV の検出報告は NoV の検出報告数と比較して少ないものの、SaV を原因とする散発性感染性胃腸炎事例の報告は増加傾向にある。また、最近では、大人を含む SaV 集団感染事例も報告されている。NoV、SaV 感染症はいずれも下痢、嘔吐が主症状であり、臨床症状から両者を区別することは困難である。感染性胃腸炎の原因ウ

ウイルスとして我が国では NoV の検出は広く行われているが、SaV を検出対象に加えることは一般的でない。NoV の感染ルートとして、生牡蠣を原因とする食中毒、ヒト-ヒト間での感染が知られている。SaV についても NoV と類似のルートにより感染が起こっていると思われるが、その詳細は不明な点が多い。我々の最近の研究により、nested RT-PCR 法によって国内の河川水や、汽水域に生息するシジミ中に NoV や SaV の核酸を検出している。我々は生牡蠣の摂取によって NoV だけでなく、SaV に感染している事例が存在するのではないかと考えた。そこで本研究では生牡蠣が原因と疑われた食中毒事例の患者もしくは調理従事者の糞便について NoV および SaV の検出を行った。

B. 研究方法

1. 糞便材料

2002.1.-2006.3.の間に発生した牡蠣が原因と疑われた食中毒事例11事例、71人の糞便を解析に用いた(表)。

2. 糞便からのウイルス核酸の抽出、cDNA の合成

10% 糞便乳剤 140 μ l から QIAGEN 社の Viral RNA mini Kit を用いて、ウイルス RNA を抽出した。その後、Superscript III と random hexamer を用いて cDNA を合成し、以下の PCR 反応の鑄型とした。

3. ウイルス核酸の検出

NoV の検出には小嶋らが確立した RT-PCR 法 (J. Virol. Methods 100: 107-114., 2002)を、SaV

の検出には岡田らが確立した nested RT-PCR 法 (Arch. Virol. 147:1445-1451., 2002)を用いた。PCR 増幅産物の有無は、2%アガロースゲルにて行った。

4. ウイルスの遺伝子解析

RT-PCR もしくは nested RT-PCR によって増幅産物が得られたものについては、QIAGEN Gel Extraction Kit を用いて精製を行ったのち、pCR2.1 ベクター (Invitrogen 社)へのクローニングを行い、1つの陽性サンプルにつき最低4クローンのシーケンスを行い、系統樹解析により genogroup, genotype の決定を行った。

5. ウイルス核酸の定量

NoV の核酸定量には影山らが構築した TaqMan probe 法によるリアルタイム RT-PCR 法 (J. Clin. Microbiol. 41: 1548-1557., 2003) を、SaV 核酸の検出には我々が構築した MGB TaqMan probe 法 (J. Med. Virol. 78:1347-1353., 2006)によるリアルタイム RT-PCR 法を用いた。

C. 研究結果

2002.1.-2006.3.の間に発生した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(表)。RT-PCR 法によって増幅した構造タンパク質の一部領域を用いた遺伝子解析により、検出された NoV 株は GI/genotype 1, 2, 3, 4, 5, 8, 10, 13, 14, 15, GII/genotype 3, 4, 5, 6, 8, 12 に分類された(表、図1)。生牡蠣による食中毒事例では、同一

人物の糞便から複数の NoV 株が検出されることが多いが、本研究でも同様の特徴が捉えられた(表)。また新たな知見として、このうち 3 事例(事例 1、5、6)については NoV に加えて SaV も検出された(表)。Nested RT-PCR 法によって増幅した構造タンパク質の一部領域を用いた遺伝子解析により、検出された SaV 株は GI/genotype 1、GII/genotype 1、2、3 に分類された(表、図 2)。本研究では同一人物の糞便から複数の SaV が検出された事例があった(表)。

さらに、RT-PCR 法もしくは nested RT-PCR 法によって NoV と SaV がともに陽性となった患者糞便について real-time RT-PCR を行った結果、3 事例いずれにおいても NoV の核酸量が優位であった(表)。

D. 考察

本研究により、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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) 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.

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

(3) 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.

(4) 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.

(5) 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.

(6) Hansman GS, Ishida S, Yoshizumi S, Miyoshi M, Ikeda T, Oka T, Takeda N. Recombinant sapovirus gastroenteritis, Japan. 13(5): 786-8., 2007.

(7) Hansman GS, Oka T, Sakon N, Takeda N. Antigenic diversity of human sapoviruses. Emerg Infect Dis. 13(10): 1519-25., 2007.

(8) 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,

学会発表

(1) 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.

(2) 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

(3) 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.

(4) 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.

(5) 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.

(6) 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.

(7) 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.

(8) 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.

(9) 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.

(10) 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.

(11) 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.

(12) 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)

(13) 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

(14) 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。

表 カキが原因と疑われた食中毒事例糞便中から検出されたノロウイルス、サポウイルス

事例	検体採取日 (月/日/年)	発生場所	有症者数	解析者数	解析者の内 訳	胃腸炎症状	Norovirus (NoV: genogroup/genotype)	Sapovirus (SaV: genogroup/ genotype)	Real-time RT-PCR (copies/g stool)		
									NoV GI	NoV GII	SaV
1	01/23/02	Home	5	3	individual	+	H1 (GI/4)	SAV-H1 (GII/2)	9.8×10^8	2.4×10^{10}	8.8×10^9
	01/23/02				individual	+	H2 (GI/4)	—	N.T.	N.T.	N.T.
	01/23/02				individual	+	H3 (GI/2)	SAV-H2a (GII/2), SAV-H2b	6.3×10^7	1.8×10^9	6.9×10^7
2	01/23/02	Restau rant	16	14	individual	+	I1 (GII/12)	—	N.T.	N.T.	N.T.
	01/24/02				individual	+	—	—	N.T.	N.T.	N.T.
	01/24/02				individual	+	I3a (GI/13), I3b (GI/4)	—	N.T.	N.T.	N.T.
	01/24/02				individual	+	I4 (GI/13)	—	N.T.	N.T.	N.T.
	01/24/02				individual	+	—	—	N.T.	N.T.	N.T.
	01/24/02				individual	+	—	—	N.T.	N.T.	N.T.
	01/24/02				individual	+	I7 (GII/12)	—	N.T.	N.T.	N.T.
	01/24/02				individual	+	—	—	N.T.	N.T.	N.T.
	01/24/02				individual	+	—	—	N.T.	N.T.	N.T.
	01/24/02				food-handler	—	I10a (GI/4), I10b (GI/13)	—	N.T.	N.T.	N.T.
	01/24/02				food-handler	—	—	—	N.T.	N.T.	N.T.
	01/24/02				food-handler	—	—	—	N.T.	N.T.	N.T.
	01/24/02				individual	+	I13 (GII/12)	—	N.T.	N.T.	N.T.
	01/24/02				individual	+	I14 (GII/12)	—	N.T.	N.T.	N.T.
3	01/30/02	Restau rant	39	2	individual	+	J1 (GI/2), J1 (GII/12)	—	N.T.	N.T.	N.T.
	01/25/02				individual	+	—	—	N.T.	N.T.	N.T.
4	02/26/02	Home	8	4	individual	+	K1 (GII/5)	—	N.T.	N.T.	N.T.
	02/28/02				individual	+	K2 (GII/5)	—	N.T.	N.T.	N.T.
	03/01/02				individual	+	K3 (GII/3)	—	N.T.	N.T.	N.T.
	03/01/02				individual	+	K4 (GI/4)	—	N.T.	N.T.	N.T.
5	12/25/02	Home	5	4	individual	+	L1a (GI/15), L1b (GI/8), L1a (GII/4), L1b	—	N.T.	N.T.	N.T.
	12/25/02				individual	+	L2a (GI/10), L2b (GI/13), L2c (GI/4)	—	N.T.	N.T.	N.T.
	12/25/02				individual	+	L3 (GI/14), L3 (GII/3)	SAV-L3 (GI/1)	5.8×10^9	2.8×10^9	2.1×10^9
	12/25/02				individual	+	L4 (GI/14), L4 (GII/5)	—	N.T.	N.T.	N.T.
6	02/07/03	Restau rant	3	4	individual	+	N1 (GI/8)	—	N.T.	N.T.	N.T.
	02/07/03				individual	+	N2 (GI/4)	SAV-N4 (GII/3)	2.6×10^8	3.5×10^8	1.9×10^8
	02/07/03				individual	+	N3 (GI/4)	SAV-N5 (GII/1)	4.5×10^9	—	2.1×10^9
	02/09/03				food-handler	—	—	—	N.T.	N.T.	N.T.
7	02/16/03	Restau rant	5	3	individual	+	O1 (GI/8), O1 (GII/6)	—	N.T.	N.T.	N.T.
	02/17/03				food-handler	—	O2a (GI/1), O2b (GI/4)	—	N.T.	N.T.	N.T.
	02/18/03				individual	+	O3a (GII/8), O3b (GII/6)	—	N.T.	N.T.	N.T.
8	03/01/03	Restau rant	12	14	individual	+	P1a (GI/4), P1b (GI/8)	—	N.T.	N.T.	N.T.
	03/01/03				individual	+	P2 (GI/8), P2 (GII/3)	—	N.T.	N.T.	N.T.
	03/01/03				individual	+	P3 (GII/4)	—	N.T.	N.T.	N.T.
	03/01/03				individual	+	P4a (GI/2), P4b (GI/8)	—	N.T.	N.T.	N.T.
	03/01/03				individual	+	P5 (GII/5)	—	N.T.	N.T.	N.T.
	03/01/03				food-handler	—	—	—	N.T.	N.T.	N.T.
	03/01/03				food-handler	—	—	—	N.T.	N.T.	N.T.
	03/01/03				food-handler	—	—	—	N.T.	N.T.	N.T.
	03/01/03				food-handler	—	—	—	N.T.	N.T.	N.T.
	03/01/03				food-handler	—	—	—	N.T.	N.T.	N.T.
	03/01/03				food-handler	—	—	—	N.T.	N.T.	N.T.
	03/01/03				food-handler	—	—	—	N.T.	N.T.	N.T.
	03/01/03				food-handler	—	—	—	N.T.	N.T.	N.T.
	03/01/03				individual	+	P14 (GI/2)	—	N.T.	N.T.	N.T.
9	12/16/04	Monste ry	9	4	individual	+	R1 (GI/3)	—	N.T.	N.T.	N.T.
	12/18/04				individual	+	R2 (GI/3)	—	N.T.	N.T.	N.T.
	12/17/04				individual	+	R3 (GI/1)	—	N.T.	N.T.	N.T.
	12/18/04				individual	+	—	—	N.T.	N.T.	N.T.
10	02/14/06	Restau rant	19	15	food-handler	—	S1 (GI/8)	—	N.T.	N.T.	N.T.
	02/14/06				individual	+	S2 (GI/8), S2 (GII/4)	—	N.T.	N.T.	N.T.
	02/14/06				individual	+	S3 (GII/3)	—	N.T.	N.T.	N.T.
	02/14/06				individual	+	S4 (GI/8), S4 (GII/3)	—	N.T.	N.T.	N.T.
	02/14/06				individual	+	S5 (GII/3)	—	N.T.	N.T.	N.T.
	02/14/06				individual	+	S6 (GI/8)	—	N.T.	N.T.	N.T.
	02/14/06				individual	+	S7 (GI/8)	—	N.T.	N.T.	N.T.
	02/14/06				individual	+	S8 (GI/8), S8 (GII/6)	—	N.T.	N.T.	N.T.
	02/14/06				individual	+	S9 (GII/5)	—	N.T.	N.T.	N.T.
	02/14/06				individual	+	S10 (GI/8), S10 (GII/3)	—	N.T.	N.T.	N.T.
	02/14/06				individual	+	S11 (GII/4)	—	N.T.	N.T.	N.T.
	02/14/06				individual	+	S12a (GI/14), S12b (GI/5), S12a (GII/3),	—	N.T.	N.T.	N.T.
	02/14/06				individual	+	—	—	N.T.	N.T.	N.T.
	02/14/06				individual	+	S14 (GI/8)	—	N.T.	N.T.	N.T.
02/14/06	individual	+	—	—	N.T.	N.T.	N.T.				
11	03/07/06	Restau rant	11	4	food-handler	—	—	—	N.T.	N.T.	N.T.
	03/07/06				individual	+	T2a (GI/8), T2b (GI/3)	—	N.T.	N.T.	N.T.
	03/07/06				individual	+	T3 (GI/8)	—	N.T.	N.T.	N.T.
	03/07/06				individual	+	T4 (GI/8), T4 (GII/3)	—	N.T.	N.T.	N.T.

N.T.: not tested

図1 カキが原因と疑われた食中毒事例糞便中から検出されたノロウイルス

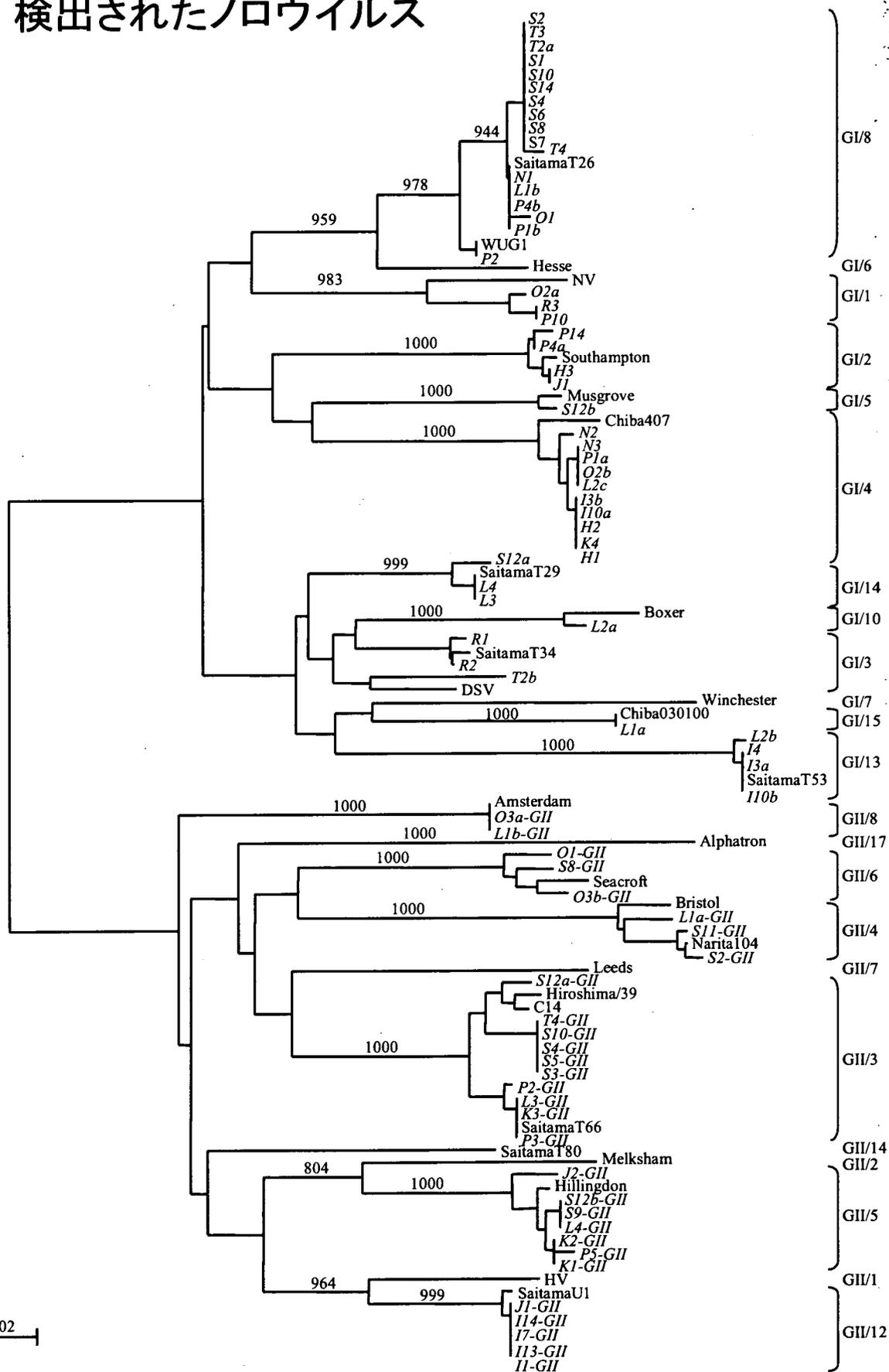
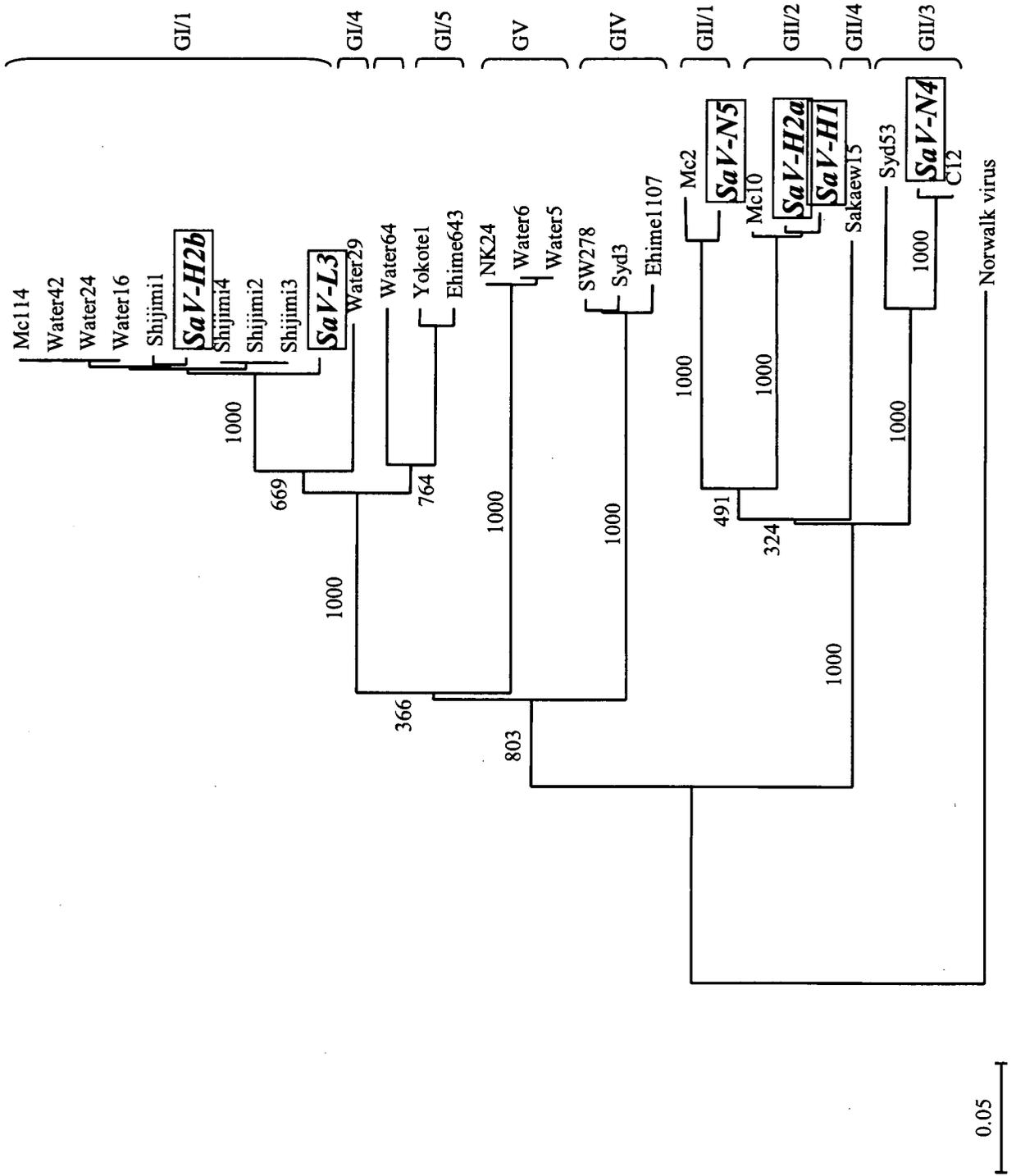


図2 カキが原因と疑われた食中毒事例糞便中から検出されたサポウイルス



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」

分担研究報告書

Detection of human enteric viruses in Japanese clams

分担研究者 Grant S. Hansman 国立感染症研究所 ウイルス第2部

研究協力者

Tomoichiro Oka 国立感染症研究所 ウイルス第2部

Tian-Cheng Li 国立感染症研究所 ウイルス第2部

Osamu Nishio 国立感染症研究所 感染症情報センター

野田 衛 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

Naokazu Takeda 国立感染症研究所 ウイルス第2部

研究要旨

A total of 57 clam packages that were collected from supermarkets and fish markets from 11 different sites in Western Japan between December 8th and September 6th, 2006 were examined for human enteric viruses (i.e., norovirus, Aichi virus, rotavirus, adenovirus, hepatitis A virus, and astrovirus) using PCR and reverse transcription-PCR. Sixty-one-percentage of packages were contaminated with one type of virus, 9% had two different types of viruses, 28% had three different types of viruses and 9% had at least four different types of viruses.

A. 研究目的

Gastroenteritis is one of the leading causes of death by an infectious disease, with more than 700 million cases of acute diarrhoeal disease occurring annually. The main viral agents that cause gastroenteritis are norovirus, rotavirus, sapovirus, astrovirus, and enteric adenoviruses. Other important viral agents

that can accumulate in oysters and clams are hepatitis A virus (HAV) and hepatitis E virus (HEV). The impact of viral contamination in the environment is clearly evident in Japan where outbreaks of norovirus oysters-associated gastroenteritis increases in winter and this coincides with the oyster-harvesting season in winter. The detection methods

for these viruses in environmental samples and clinical specimens have greatly improved over the past ten years and have provided a better understanding and distribution of these viruses.

The purpose of this study was to detect norovirus, Aichi virus, rotavirus, adenovirus, HAV, and astrovirus in clam packages sold at supermarkets and fish markets that were destined for human consumption in Japan using PCR and reverse transcription-PCR and then describe the genetic diversity of the positive noroviruses.

B. 研究方法

Clam samples. A total of 57 clam (*Corbicula japonica*) packages (i.e., 30-60 clams per package) were collected from supermarkets or fish markets (non-export) from 11 different geographically distinct sites in Western Japan between December 8th, 2005 and September 6th, 2006. The clam packages were screened for norovirus, Aichi virus, rotavirus, adenovirus, HAV, and astrovirus using PCR and RT-PCR. These 57 packages were previously screened for sapovirus and 46 of 57 packages were screened for HEV.

Viral extraction. The clams were

shucked, and the digestive diverticulum removed by dissection on the day of harvest and then weighed and homogenized in nine times their weight of phosphate-buffered saline (PBS) without magnesium or calcium. In brief, one gram of digestive diverticulum (10-15 clams per package) was homogenized with an Omni-mixer in 10 ml of phosphate-buffered saline (pH 7.2). After centrifugation at $10,000 \times g$ for 30 min at 4°C, the supernatant was layered onto 1 ml of 30% sucrose solution and ultracentrifuged at $154,000 \times g$ for 3 h at 4°C. The pellet was resuspended in 140 μ l of distilled water and stored at -80 °C until use.

DNA and RNA extraction and reverse transcription. Viral DNA (for detection of adenovirus) was extracted from the resuspended pellet using QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Viral RNA (for detection of norovirus, Aichi virus, rotavirus and HAV) was extracted from the resuspended pellet using QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). For reverse-transcription (RT), the RNA solution was treated with 2 U of RNase-free DNase I (Takara, Tokyo, Japan) for 30 min at 37°C followed by the inactivation of the enzyme at 75°C for

5 min. RT was performed with 15 µl of RNA solution and 15 µl of RT mixture that contained 1 mM dNTP mixture, 10 mM dithiothreitol, 0.75 µg random hexamers (Takara, Tokyo, Japan), 33 U RNase inhibitor (Takara Tokyo, Japan), 300 U reverse transcriptase Superscript II (Invitrogen, San Diego, CA) and 4.5 µl Superscript II buffer.

PCR. For norovirus PCR, the primers were designed to amplify the 5' prime end of the capsid gene. Briefly, for norovirus GI, COG1F and G1SKR primers were used for the 1st PCR and then G1SKF and G1SKR primers were used for the nested PCR. For norovirus GII, COG2F and G2SKR were used for the 1st PCR and then G2SKF and G2SKR primers were used for the nested PCR. For Aichi virus, C94b and 264K primers were used and these were designed to amplify the 3C/D junction (protease/polymerase). For rotavirus (Group A), primers were designed to amplify the major outer capsid glycoprotein VP7 and the rotavirus type was determined by PCR size. For adenovirus, primers were designed to detect the E1B region of enteric adenoviruses, i.e., Ad40 and Ad41, and determined by PCR size. For HAV, we used a set of nested in-house primers

designed to amplify the capsid gene. For HAV first PCR, we used sense HAV+2799 primer (5'-ATTCAGATTAGACTGCCTTGGTA-3') and antisense HAV-3273 primer (5'-CCAAGAAACCTTCATTATTTTCATG-3'). For HAV nested PCR, we used sense HAV+2907 primer (5'-GCAAATTACAATCATTCTGATGA-3') and antisense HAV-3162 primer (5'-CTTCYTGAGCATACTTKARTCTTG-3'). The HAV PCR conditions were the same as norovirus. For astrovirus, PreCAP1 and 12GR primers were used to amplify the 1st PCR product and then Mon244 and 82b primers were used for nested PCR, which were designed to amplify the 5' prime end of the capsid gene. Two types of positive controls and a virus-free negative control per five assays for norovirus PCR were used. All PCR products were analyzed by 2% agarose gel electrophoresis and visualized by ethidium bromide staining. Norovirus, Aichi virus and HAV nucleotide sequences were prepared as previously described.

Sequence analysis. Norovirus, Aichi virus and HAV nucleotide sequences were prepared with the terminator cycle sequence kit (version 3.1, Applied Biosystems, Warrington, UK) and

determined with the ABI 3130 sequencer (ABI, Boston, MA). In order to determine the norovirus genotypes in the packages with multiple genotypes we cloned the RT-PCR products into pCR2.1 (Invitrogen) and at least four clones from each sample were sequenced. The genetic diversity of the adenoviruses was not determined in this study. Norovirus nucleotide sequences were aligned with Clustal X and the distances were calculated by Kimura's two-parameter method. The norovirus nucleotide sequence data determined in this study has been deposited in GenBank under accession numbers EF424485-EF424557.

C. 研究結果

Thirty-five of 57 (61%) packages were contaminated with one type of virus, 5 of 57 (9%) packages were contaminated with two different types of viruses, 16 of 57 (28%) packages were contaminated with three different types of viruses and 5 of 57 (9%) packages were contaminated with at least four different types of viruses (Table 1). Astrovirus was not detected in any of the packages.

Noroviruses. Thirty-one of 57 (54%) packages were contaminated with noroviruses (Table 1). Norovirus GI and GII sequences were detected in 24 and 23

packages, respectively (Figure 1). A total of 24 norovirus GI sequences were detected and these clustered into nine different GI genotypes (Fig. 2), including one unpublished GI genotype (GI/1, GI/2, GI/4, GI/5, GI/8, GI/11, GI/12, GI/14, and GI/New). A total of 23 norovirus GII sequences were detected and these clustered into eight different GII genotypes (Fig. 2), including one unpublished GII genotype (GII/2, GII/3, GII/4, GII/5, GII/6, GII/7, GII/9, and GII/New). More than half of the norovirus-positive packages, 20 of 31 (65%), contained two or more norovirus genotypes. Twenty-three of 31 (74%) norovirus-positive packages were co-contaminated with two or more other types of viruses (Table 1).

Aichi virus. We found that 19 of 57 (33%) packages were contaminated with Aichi viruses. The 19 Aichi virus sequences shared over 95% nucleotide homology, suggesting that the same strain contaminated the clams. These 19 sequences closely matched (approximately 95% nucleotide homology) genogroup A sequences found on the database (data not shown). All of the Aichi virus-positive packages were co-contaminated with other viruses (Table 1).

Rotavirus. Fourteen of 33 (42%) packages were contaminated with rotavirus (24 packages were unavailable for screening). Six different rotavirus G types were detected, i.e., G1, G2, G3, G4, G8, and G9. Of the 14 rotavirus-positive packages nine (53%) contained two or more rotavirus G types (Table 1).

Adenovirus. Seventeen of 33 (52%) packages were contaminated with adenoviruses using primers designed to detect the two enteric adenoviruses, i.e., Ad40 and Ad41. Fourteen of 17 (82%) adenovirus-positive packages were co-contaminated with other viruses (Table 1).

HAV and HEV. One of 57 (2%) packages was contaminated with HAV. Sequence analysis of the capsid gene indicated that it belonged to subtype IA. HEV was previously detected in 2 of 46 packages. An additional 11 packages were screened for HEV, however these were all negative (Table 1).

D. 考察

This study has shown that the Japanese clams were highly contaminated with many types of human enteric viruses capable of causing gastroenteritis and/or

acute viral hepatitis. At present, the Enforcement Regulation of Food Sanitation Law mainly focuses on bacteria contamination, in Japan. Clearly, regulations and standards need to be revised in order to address this problem with viral contamination in the Japanese clams. The health risks associated with eating contaminated oysters have been well documented, but further studies are clearly needed in order to determine the health risks associated with eating these contaminated Japanese clams.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) 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.

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

(3) 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.

(4) 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.

(5). 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.

(6) Hansman GS, Ishida S, Yoshizumi S, Miyoshi M, Ikeda T, Oka T, Takeda N. Recombinant sapovirus gastroenteritis, Japan. *Emerg Infect Dis.* 13(5): 786-8., 2007.

(7) Hansman GS, Oka T, Sakon N, Takeda N. Antigenic diversity of human sapoviruses. *Emerg Infect Dis.* 13(10): 1519-25., 2007.

(8) Ozawa K, Oka T, Takeda N, Hansman GS. (2007) Norovirus infections in symptomatic and asymptomatic food handlers in Japan. *J Clin Microbiol* 45: 3996-4005., 2007.

(9) 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,

学会発表

(1) 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.

(2) 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

(3) 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.

(4) 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。

(5) 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。

(6) 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。

(7) 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。

(8) 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。

(9) 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。

(10) 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。

(11) 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。

(12) 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)

(13) 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