

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 隆宇、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。

ノロウイルスと血液型抗原との結合に関する研究

分担研究者 白土 東子 国立感染症研究所・ウイルス第2部・主任研究官

研究要旨：Norovirus (NoV) 全体の総括的な血液型抗原結合パターンを解析し、ウイルス結合に重要な糖鎖構造を明らかにするため、NoV GI に属する 5 株、5 クラスター、NoV GII に属する 11 株、8 クラスター、計 13 クラスター16 株の NoV VLPs を用い、Carbohydrate-VLPs binding assay により血液型抗原との結合パターンを検討した。その結果、糖鎖のわずかな構造の違いがウイルスの結合量を左右していることが明らかになった。さらに詳細な解析を行うことにより、血液型抗原上のウイルス結合部位を明らかにしたい。

A. 研究目的

ノロウイルスは小腸上皮に感染し、未だ明らかでない機構によって下痢を引き起こす。近年、小腸上皮に発現する血液型抗原にノロウイルスが吸着することが報告された。しかし、血液型抗原が細胞へのウイルス吸着に関与する分子なのか、侵入にも関わるレセプターなのかは明らかになっていない。また、結合に重要な糖鎖構造も明らかになっていない。ノロウイルスは遺伝学的、血清学的に多様であり、ウイルス株によって認識する血液型抗原が異なることが報告されている。本研究では、ノロウイルス全体の総括的な血液型抗原結合パターンを解析し、ウイルス結合に重要な糖鎖構造を明らかにすることを目指す。

B. 研究方法

7 種類 の 合 成 糖 鎖 、

Fuc α 1-2Gal β 1-3GlcNAc β -R1 (H type 1-trisaccharides) 、
Fuc α 1-2Gal β 1-4GlcNAc β -R1 (H type 2-trisaccharides) 、
Fuc α 1-2Gal β 1-3GalNAc α -R1 (H type 3-trisaccharides) 、
Gal β 1-3GlcNAc β -R1 (H type 1 precursor-disaccharides) 、
Gal β 1-4GlcNAc β -R1 (H type 2 precursor-disaccharides) 、
Gal β 1-3GalNAc α -R1 (H type 3 precursor-disaccharides) 、
Fuc α 1-2Gal β -R1 (H-disaccharides) (Glycotech corporation) と VLPs との結合を Carbohydrate-VLP binding assay (ELISA-based) にて検出した。ピオチンラベルされた合成糖鎖を Tris-buffered saline にて 10mg/ml に調製し、Streptavidin-precoated microwells

(Thermo Labsystems) に加え、37°Cで2時間コーティングを行った。5% skim milk (SM) /PBS にて、4°Cで一晩ブロッキングを行った後に、rNoV VLPs (1 mg/mL in 1% SM/PBS-T (0.05% Tween 20/PBS)) を加え、37°Cで1時間インキュベーションした。次いで rabbit anti-rNoV VLPs antiserum (at 1/2000 in 1% SM) を加え37°Cで1時間、horseradish peroxidase (HRP) -conjugated anti-rabbit IgG (Zymed Laboratories Inc.) を加え37°Cで1時間インキュベーションを行った。O-phenylenediamine (Sigma) を基質として加え発色させた後に、492 nm にて吸光度を測定した。

C. 研究成果

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。残り 2 株はいずれのタイプにも強く結合したが、その結合も、H-disaccharides において失われ、前述の 7 株同様、タイプ間の糖鎖構造の差を認識していることが示唆された。

D. 考察と結論

A 型インフルエンザの宿主特異性は、そのレセプター上のシアル酸とガラクトースをつなぐ linkage が $\alpha 2-3$ か $\alpha 2-6$ によって決定されることが知られている。私たちは、ノロウイルス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。ノロウイルスは遺伝学的、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。今後、さらに詳細な解析を行い、血液型抗原上のノロウイルス結合部位を明らかにすることにより、血液型抗原への結合を阻害する薬剤の開発を目指したい。

D. 研究発表

1. 誌上発表

- (1) 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
- (2) Shirato-Horikoshi H. Histo-blood group antigens and norovirus. Glycoforum. <http://www.glycoforum.gr.jp/>
- (3) 白土 (堀越) 東子: 冬の食中毒: ノロウイルス. 保健ニュース 第 1356 号付録, 2007. 少年写真

新聞社

- (4) 白土（堀越）東子：冬の食中毒：ノロウイルス。小学保健ニュース 第 804 号付録, 2007. 少年写真新聞社
- (5) 白土（堀越）東子：ノロウイルスと血液型抗原。食品衛生研究 57(11)：27-34, 2007. 社団法人日本食品衛生協会
- (6) 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
- (7) 白土（堀越）東子：ノロウイルスと血液型抗原。グライコフォ

ー ラ ム

<http://www.glycoforum.gr.jp/>

2. 学会発表

- (1) 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

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 協力研究報告書

田中 智之	野田 衛
吉澄 志磨	小林 慎一
三上 稔之	入谷 展弘
高橋 朱実	吉田 徹也
斎藤 博之	福田 伸治
植木 洋	田村 務
滝澤 剛則	篠崎 邦子
東方 美保	斎藤 博之
内野 清子	谷口 力夫
飯塚 節子	小暮 実
福田 伸治	岩切 章
近藤 玲子	林 志直
船津丸 貞幸	
松岡 由美子	
北元 憲利	

平成 20 (2008) 年 4 月

平成 19 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」

協力研究報告書 I

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保健科学部)
研究協力者	斎藤 博之	(秋田県健康環境センター・保健衛生部)
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	飯塚 節子	(島根県保健環境科学研究所)
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	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)
研究協力者	北元 憲利	(兵庫県立大学環境人間学部)

研究総括:

全国 14 地方衛生研究所の研究協力体制の構築と共に、平成 19 年度の本邦におけるノロウイルス (NV) の流行疫学、遺伝子学的解析、食中毒発生頻度とカキを含む食材から効率よい NV 検出方法の開発、下水処理終末放流水などによる環境汚染の実態とその影響などについて研究した。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も見られた。NV の遺伝子型の主流は GII/4 であった。

食材から NV 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 NV 遺伝子を検出でき、また食材からはパンソルビン-抗 NV 抗体-NV 複合体の形成とそれからの NV 遺伝子の検出が効果的であった。

NV ウイルス学的には、中学生には GII/4 の占める割合が多く、小学生以下には GII/4 よりも他の遺伝子型を持つ NV の感染が見られたという報告があった。さらに、サポウイルス感染の報告があり、今後のサーベイランスの重要性が示された。

A. 研究目的

2006/2007年のノロウイルス(NV)流行シーズンに見られたような大流行は2007/2008年には見られなかったものの、例年と類似した感染パターンを示した。しかし、地域によっては、昨年よりも高い流行パターンも見られている。

今年度は、東北、山陰から2衛生研究所の研究協力を得ることができ、昨年度の12地方衛生研究所に加えて14地方衛生研究所でNVの流行サーベイランス体制が確立された。この体制で、本邦におけるNV感染増加・拡大の要因を究明するサーベイランスはほぼ網羅できると思われる。

最近では、ノロウイルスのみならずサポウイルス(SV)による集団発生、食中毒事例の報告もあり、SVの診断系を確立するために1大学の研究協力者のもとに、診断系の構築に必要なSVモノクロナール抗体の作成を開始した。

B. 研究方法

昨年度と同様に、14地方衛生研究所(地衛研)において、①NV感染症の実態把握、②感染原因(要因)、とくにカキの喫食や調理従事者との関連について、③NVの遺伝子学的特徴、④食材、食品から原因NVの効率よい検出方法の開発、⑤下水処理放水などによる環境汚染、それに伴うカキ等への汚染状況と汚染防止に寄与できる手立て、の5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 NV感染症の実態把握

2007/2008年シーズンのNV感染流行パターンは、九州(松岡・熊本、船津丸・佐賀)、青森(三上・青森)などでは45~46週に流行が始まり、これは昨シーズンに比較してむしろ早い流行開始と思われる。大分県では定点あたり30以上の報告があり、優に警報値を越えて地域も見られるが、全体的には昨シーズンを凌駕していない。

②感染原因(要因)、とくにカキの喫食や調理従事者との関連

感染拡大は、昨年同様にヒト-ヒト感染による事例が多かく、特に施設内感染は昨年の2倍という報告も見られた(三上・青森)。カキ関連食中毒事例は6事例(松岡・熊本、福田・広島)の報告があるのみであり、関連事例は少ないと思われる。注目すべき警鐘的研究としてカキパック内浮遊液からNV遺伝子が検出されたという報告があり(三上・青森)、カキのみならずパック内浮遊液による調理台汚染などによる食中毒発生が懸念されている。市販カキパック取り扱いの注意点が喚起され、食品協会等に広く還元しなければならない点と考える。

調理従事者の顕性或いは不顕性NV感染率は、発生事例、場所によって異なるが、13%~33%であった。食材汚染の原因の大きな要因の一つであることは十分に考えられる。NV感染予防対策を立てる上にも、簡便なNV検出イムノクロマト法の開発などを考慮すると、定期的検便などの施行が望まれる。

③ NV の遺伝子学的特徴

NV の遺伝子解析では、本年度も流行の主流遺伝子型は GII/4 によるものであった。遺伝子型分析でも、変異株の出現が認められている。

これらの点から、NV 遺伝子は、毎年のように大なり小なりに変異を続け、ある仮説を引用すれば、大なる変異が隔年に見られそれが大きな流行に繋がるとも考えられる。

昨年度は GII/4 と共に GI/8 は将来大きな流行の可能性をもつウイルスになる予測したが、数地衛研で食中毒関連事例があるものの、大きな流行には至っていない。また、今年度は異なった遺伝子をもつ NV 混合感染事例の報告があった。また、感染事例の遺伝子学的解析で、中学生以上の年齢では GII/4 感染が有意に高く、小学生以下では GII/4 よりは様々な遺伝子型による NV 感染が高かったという報告は注目に値する(吉澄・北海道)。今後の NV 感染病理を考える上で貴重な示唆と考える。

サポウイルス感染事例の報告が見られる(飯塚・島根、近藤・愛媛)。特に愛媛では大規模食中毒事例があり SV による発病率は 44.0% という。今後、アンテナを高くして、感染様式、感染経路などの情報収集が必要で、対応策を視野に入れておく必要がある。

④ 食材、食品から原因 NV の効率よい検出方法の開発

これまで、カキを含む食材、食品から NV 遺伝子検出は困難であった。ウイルス量が少ないという問題だけで

なく、RT-PCR 法を行なう上での夾雑物の影響が大きく、検出感度を低くしていた。これを改良した二つの方法が報告された。カキでは α -アミラーゼ添加による前処理が効果的という報告があり、本報告書にもカキから効率的な NV 検出の実際が報告されている(植木・宮城)。もう一つは、パンソルビン・トラップ法で、食品中の NV をパンソルビン-抗 NV 抗体-NV 複合体を形成させ、回収後 RT-PCR 法にかけるものである(斉藤・秋田、東方・福井)。現在、開発途上であるが 2 施設から将来に実用性を持つ報告がされている。

これらの方法が一層普遍化することにより食材と NV 食中毒の因果関係の究明のみならず外部委託食品などからの NV 感染予防に大いに活用できると考える。

⑤ 下水処理放水などによる環境汚染、それに伴うカキ等への汚染状況と汚染防止

昨年度は、下水処理施設での NV 汚染対策についてきれいな対処方法が報告された(高橋・岩手)。

NV 遺伝子は下水終末処理法水中からも検出される。NV 遺伝子型が上流での NV 発生状況を反映しているという報告(船津丸・佐賀、内野・堺)もあれば、必ずしも一致していないという報告(滝澤、富山)もある。下水処理の守備範囲の地理的な背景、遺伝子型の特徴等を考慮しながら解析しなければならないであろう。

下水処理終末放流水からは NV 遺伝子が検出される。しかし、遺伝子であ

って、感染性の有無、不活化の適否(高橋・岩手)など今後の課題は大きい。

D. 今後の課題

本研究班は、今年度から 14 地方衛生研究所の協力を得て、全国の NV 感染状況、特徴を網羅できるシステムとなった。基本的には、健康危機発生時に速やかな連携と技術等の情報交換を行ないつつ、科学的に正確な情報を提供し危機終息に貢献できるシステムでありたいと考えている。

今年度の研究成果から、以下のことが課題として明らかになった。

1) 感染源対策として、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を、また、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・安全に貢献できるよう努める。

2) NV 伝播経路として昨年度から警鐘している調理従事者の NV 検査の必要性、今回の研究で明らかになったカキパック浮遊液の取り扱い注意などは食品協会など食に携わる人々に積極的に情報提供していかなければならない。

3) 大流行に大きく関与して可能性の高い NV 変異株の予測は、今後も流行事例、散発事例の区別なく、詳細に遺伝子解析を行ないつつ、発災予測対応ができ情報発信が行なえるように努める。

4) サポウイルスの大規模流行が報告された。地域性なのか、今後全国的な大流行の可能性を有しているのか、更なる流行実態把握のための努力が必要である。それと共に、簡便な診断方法は来年度中に是非、構築しなければならない。

平成19年度厚生労働科学研究補助金（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」
協力研究報告書

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

協力研究者 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）
協力研究者 石田勢津子、三好正浩、奥井登代 （北海道立衛生研究所）

研究要旨：

ノロウイルス (NV) による急性胃腸炎の発生状況を把握するため、北海道において2007年10月～2008年2月に発生した食中毒4事例及び感染症100事例について、分子疫学的解析を行った。2007/08シーズンに発生した食中毒事例はすべて、調理従事者による食品汚染が原因と考えられた事例であり、検出されたNVの遺伝子型は4事例ともGenogroup II, Genotype 4 (GII/4)であった。感染症事例においては、中学生以上の年齢層の事例では、69事例中65事例(94%)からGII/4が検出された。一方、小学生以下の年齢層の事例では、GII/4が検出された事例の割合は45%であり、その他に様々な遺伝子型(GII/2, 3, 5, 13, GI/3, 4, 8, 11, 14)のNVが検出された。2007/08シーズンに検出されたGII/4 NVは、2008年1月に発生した1事例を除き、前シーズンの流行型と同じEU2006bタイプであった。

A. 研究目的

ノロウイルス (NV) の流行状況を把握するためには、分子疫学的なデータの蓄積が必要である。そこで本研究では、2007/08シーズンに北海道において発生した集団胃腸炎事例について、胃腸炎患者から検出されたNVの遺伝子型を指標とした分子疫学的解析を行い、過去シーズンとの比較を行った。

B. 研究方法

1. 調査対象

北海道において2007年10月～

2008年2月に発生し、当所においてNV遺伝子が検出された集団胃腸炎104事例(糞便512検体、吐物1検体)を対象とした。対象事例の発生施設別内訳は、食中毒4事例(飲食店3事例、旅館1事例)、感染症100事例(高齢者施設30事例、保育所・幼稚園19事例、小学校10事例、社会福祉施設9事例、医療機関7事例、会合6事例、旅行・宿泊施設5事例、中・高校4事例、小中高校生イベント・大会3事例、その他7事例)であった。

2. 検査方法

(1) ノロウイルス遺伝子の検出

RNA 抽出用の材料として、糞便は 10%乳剤、吐物は 50%乳剤を使用した。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 を用いた。PCR 産物についてはダイレクトシーケンス法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。

(2) GII/4 ノロウイルスの分類

検出された NV の遺伝子型が GII/4 と同定された事例から、それぞれ 1 または 2 検体を選出し、プライマー：G2-SKF/3IIR-4 (5' -CCRCRAAGAAAGCTCCAGCCA-3') を用いた RT-PCR により、キャプシド領域全長の増幅を行った。ダイレクトシーケンス法により、プライマー：GII-5a (5' -GTHGTYCARCCACAAAATGG-3') / GII-2Ra (5' -AAGTGCTGCACCCAYTCYTG-3') 間の 568 塩基 (Lordsdale position:5876-6443) の配列を決定し、解析に用いた。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

2007/08 シーズンの NV による集団

胃腸炎の発生状況を、過去 4 シーズンと比較した (図 1; 2007/08 シーズンは 2 月までの集計結果)。2007/08 シーズンの事例発生数は、過去最多であった 2006/07 シーズンに比べると約半数に減少したが、それ以前のシーズンと比べると、1.25 倍程度の増加が認められた。2004/05 及び 2005/06 シーズンの事例発生ピークは 1 月であったが、2006/07 シーズンはピークが 1 ヶ月早くなり、2007/08 シーズンはさらに 1 ヶ月早く、11 月がピークであった。

2007/08 シーズンの事例について、食中毒と感染症事例の月別発生数を、図 2 に示した。104 事例のうち、食中毒事例は 4 事例 (4%) のみであり、10 月から翌年 1 月にかけて、毎月 1 事例ずつ発生した。感染症事例は 100 事例であり、全事例数の 96% を占めた。

2. 食中毒事例

2007/08 シーズンに発生した食中毒 4 事例の検査結果について、表 1 に示した。食品については残品がなく、検査を実施することができなかった。

(1) 事例 1

2007 年 10 月 31 日発生。原因施設は飲食店であり、この飲食店で調理された弁当を食べた会合参加者 41 名中 24 名、この飲食店で会食を行った 9 名中 1 名が胃腸炎を発症した。また、会合参加者が持ち帰った弁当を食べた家族からも発症者が認められた。当所において、弁当喫食の 7 名及び会食の 2 名中 1 名から NV を検出した。調理従事者 6 名は全員健常者であったが、このうち 2 名から

NVが検出された。患者と調理従事者から検出されたNV遺伝子の塩基配列は、ポリメラーゼ・キャプシド領域ともに100%一致、遺伝子型はGII/4であった。

(2) 事例2

2007年11月18日発生。原因施設は飲食店であり、この飲食店で調理された弁当を食べた事業所の職員等67名中17名が胃腸炎を発症した。当所において検査を行った患者6名及び調理従事者4名全員から、NVが検出された。調理従事者は、4名全員が胃腸炎を発症しており、このうち3名は弁当調理日より前に発症していた。患者と調理従事者から検出されたNV遺伝子の塩基配列は、ポリメラーゼ・キャプシド領域ともに100%一致し、遺伝子型はGII/4であった。

(3) 事例3

2007年12月17日発生。原因施設は飲食店であり、この飲食店で調理された弁当を食べた会合A及び会合Bの参加者等254名中69名が胃腸炎を発症した。当所において、会合A参加者8名中6名、会合A参加者が持ち帰った弁当を食べた3名及び会合B参加の2名からNVを検出した。調理従事者5名は全員健常者であったが、このうち2名からNVが検出された。患者と調理従事者から検出されたNV遺伝子の塩基配列は、ポリメラーゼ・キャプシド領域ともに100%一致、遺伝子型はGII/4であった。

(4) 事例4

2008年1月23日発生。原因施設は旅館であり、宿泊客24名中10名が胃腸炎を発症した。当所において、宿泊客5名及び調理従事者2名中1名からNVを検出した。宿泊客の初発は23日の夜であったが、調理従事者2名のうち1名が22日朝に胃腸炎を発症しており、この調理従事者と患者から検出されたNV遺伝子の塩基配列は、ポリメラーゼ・キャプシド領域ともに100%一致した。遺伝子型はGII/4であった。

3. 感染症事例から検出されたノロウイルスの遺伝子型

2007/08シーズンに検出されたNVの遺伝子型を、発生施設別に図3に示した。感染症事例のうち、中学生以上の年齢層を主体とする事例においては、GII/4が検出された事例の割合が非常に高かった。中・高校4事例、社会福祉施設9事例、医療機関7事例、会合6事例では、すべての事例からGII/4が検出された。また、高齢者施設では30事例中29事例、旅行・宿泊施設は5事例中4事例、「その他」の事業所では6事例中5事例からGII/4が検出された。「学生イベント」のうち、高校生スポーツ大会の事例からも、GII/4 NVが検出された。一方、小学生以下の年齢層を主体とする事例では、GII/4の割合が最も高いものの、その他の遺伝子型も多数検出された。保育所・幼稚園19事例のうち、GII/4が検出されたのは9事例であり、その他、GII/2が3事例、GI/4とGII/13

が2事例ずつ、GII/3が1事例、GI/14とGII/4の混合が1事例、GI/8とGII/3の混合が1事例であった。小学校10事例の内訳は、GII/4が5事例、GII/2が2事例、GII/5とGII/13がそれぞれ1事例、GI/11とGII/2の混合が1事例であった。また、「学生イベント」のうち、小中学生のスポーツ大会と小学校のイベントの事例からは、GI/3が検出された。小学生以下の年齢層を主体とする31事例について、GII/4が検出された事例の割合を、発生月別に図4に示した。GII/4が検出された事例の割合は、事例発生ピークの11月には67%と高かったが、12月は38%、翌年1月は20%と減少し、2月は0%であった。

4. GII/4 ノロウイルスの分類

GII/4が検出された食中毒4事例及び感染症80事例(GI/14とGII/4の混合1事例を含む)からそれぞれ代表株を1または2検体、合計86検体選出し、キャプシドのP2サブドメインを含む領域(568塩基)の塩基配列を決定した。この塩基配列をもとに系統樹解析を行った結果、食中毒4事例及び感染症79事例から検出されたGII/4 NVは、前シーズンの北海道流行株と同じクラスターに属し、Nijmegen115/2006 (EF126966) ; EU2006b variant に近縁なタイプであった。2008年1月の感染症1事例から検出されたGII/4株のみ、Terneuzen70/2006 (EF126964) ; EU2006a variant が属するクラスターに分岐した。

D. 考察

最近の北海道では、NVによる集団胃腸炎事例の1割が食中毒、9割が感染症事例となっている。しかし、2007/08シーズンは、食中毒事例の件数が大幅に減少し、4事例のみの発生であった。4事例すべて、調理従事者による食品汚染が原因と考えられた事例であり、二枚貝喫食による食中毒の報告はなかった。調理従事者については、不顕性感染者による食品汚染が問題となっているが、今回、原因食品の調理以前に発症していた調理従事者により食品が汚染されたと考えられる事例が2件確認された。胃腸炎発症者が調理に従事することによるNV汚染のリスクについて、周知の必要があると考えられた。

2007/08シーズンの食中毒4事例から検出されたNVは、すべてGII/4であり、感染症事例についても、GII/4の検出率が高かった(79%)。また、2007/08シーズンに検出されたGII/4は、1事例を除くすべてがEU2006bタイプであった。EU2006b variant は、北海道では2006年9月に初めて出現し、2006/07シーズンに大流行したタイプであり、同じEU2006bタイプのGII/4 NVによる流行が2シーズン続いたことが明らかとなった。そこで、この2シーズンの事例発生状況を比較してみると、2006/07シーズンは過去最大規模の事例発生数であったが、2007/08シーズンは、2006/07シーズンの約半数に減少した(図1)。また、全事例あたりのGII/4が検出された割

合は、2006/07 シーズンは 95%、2007/08 シーズンは 80%であり、特に小学生以下の低年齢層の事例において顕著な違いが認められた（2006/07 シーズン：71%、2007/08 シーズン：45%）。このような、新規 GII/4 variant が流行したシーズンは事例数の増加と高い GII/4 検出率が認められ、前シーズンと同じタイプの GII/4 が流行したシーズンは事例数の増加が見られず GII/4 検出率が前シーズンより低下する、という現象は、過去、新規 GII/4 variant として EU2004 タイプが流行した 2004/05 と翌年 2005/06 シーズンにも認められた。以上のように、新規 GII/4 variant の出現及び流行が、集団胃腸炎事例の発生状況に影響を与える可能性が考えられ、今後も検討を続ける必要があると思われた。

また、2007/08 シーズンの特徴として、事例発生ピークが例年より 2 ヶ月程度早かったことが挙げられる。2007/08 シーズンは、11 月に入って、GII/4 による事例数が急増した。しかし、小学生以下の年齢層の事例において、12 月以降、GII/4 の検出される割合が急速に低下したこと（図 4）からも伺われるように、GII/4 の流行は早期に終息し始めており、その結果、ピークの時期が例年より早くなったと推測された。同じ GII/4 の EU2006b タイプが流行した 2006/07 シーズンの事例発生数も、11 月に急増し、1 月以降速やかに流行が終息した。この 2 シーズンの事例発生状況から、2006b variant は、他の GII/4 NV に比べて、より感

染拡大を起こしやすい特徴を備えているのではないかと推測された。そのため、感染拡大が速やかに起こり、早く拡大したために免疫獲得者の割合が急速に増加し、早い時期に流行が終息に向かったのではないかと考えられた。GII/4 variant のウイルス学的特徴については興味深いところであり、今後の情報の蓄積が待たれる。

E. 結論

1. 2007/08 シーズンの事例発生ピークは 11 月であり、例年と比べ 2 ヶ月程度早かった。
2. 104 事例のうち、感染症事例が 96%（100 事例）を占め、食中毒事例は 4%（4 事例）のみであった。
3. 食中毒 4 事例はすべて調理従事者による食品汚染が原因と考えられた事例であった。4 事例のうち 2 事例の調理従事者は、原因食品の調理日以前に胃腸炎を発症しており、残り 2 事例の調理従事者は、不顕性感染者であった。
4. 流行遺伝子型は、前シーズンに引き続き GII/4 の EU2006b タイプであったが、小学生以下の年齢層においては、半数以上の事例から様々な遺伝子型の NV が検出された。
5. 新規 GII/4 variant の出現及び流行と集団胃腸炎事例の発生状況の関連性について、さらに検討を進める必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

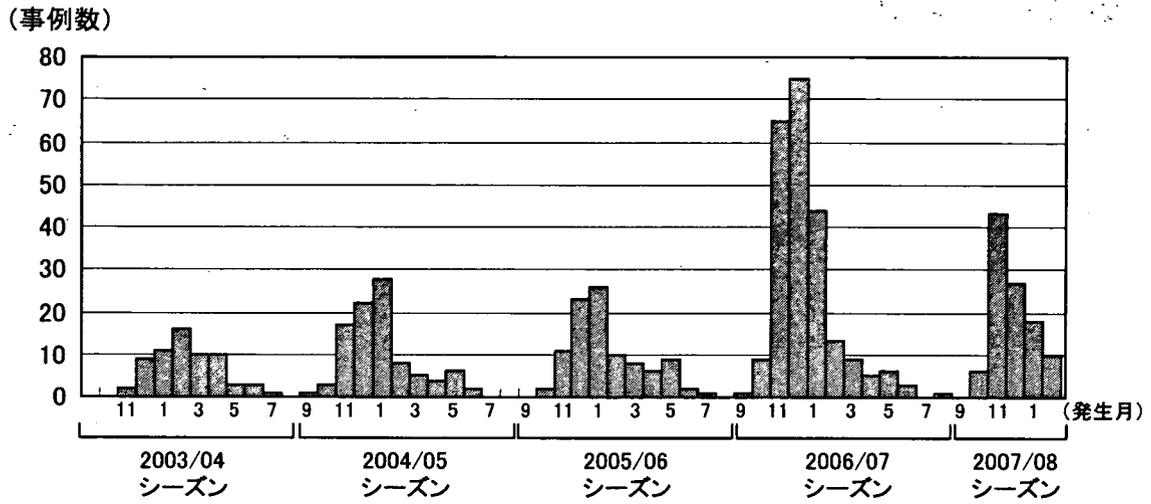


図1 過去5シーズンのノロウイルスによる集団胃腸炎事例の発生数

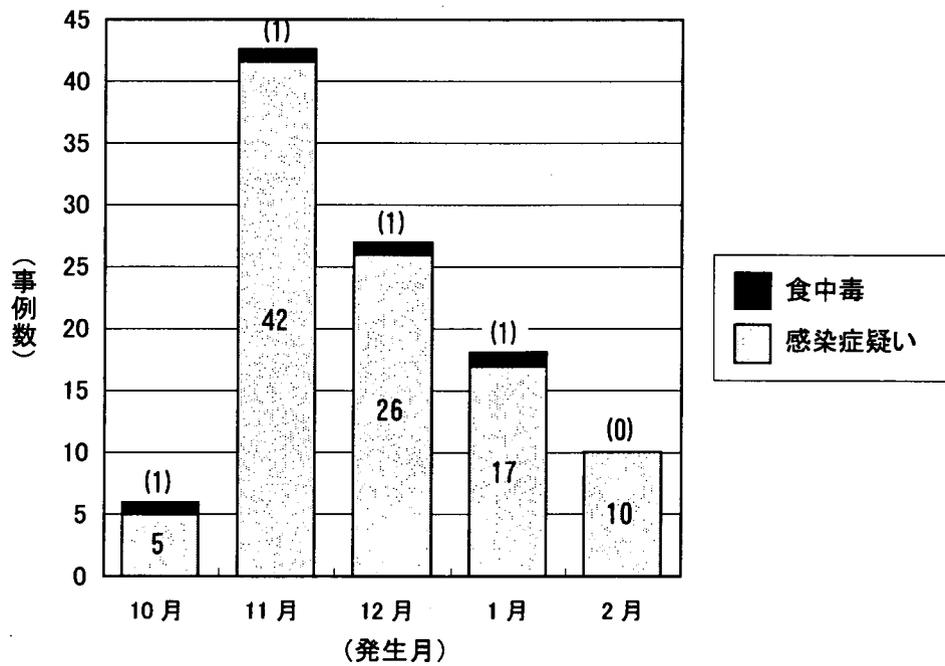


図2 2007/08シーズンのノロウイルスによる集団胃腸炎事例の発生状況

表1 食中毒事例の検査結果

	発生 年月日	患者数 /喫食者数	発生場所	原因施設	原因 食品	RT-PCR 結果 (陽性数/検査数)				遺伝子型
						患者	調理従事者		食品	
							健常者	発症者		
1	2007.10.31	24 / 41 1 / 9	会合 飲食店	飲食店	弁当 食事	7/7 1/2	2/6	-	NT	GII/4
2	2007.11.18	17 / 67	事業所等	飲食店	弁当	6/6	-	4/4	NT	GII/4
3	2007.12.17	69 / 254	会合等	飲食店	弁当	11/13	2/5	-	NT	GII/4
4	2008. 1.23	10 / 24	旅館	旅館	食事	5/5	0/1	1/1	NT	GII/4

※NT: not tested

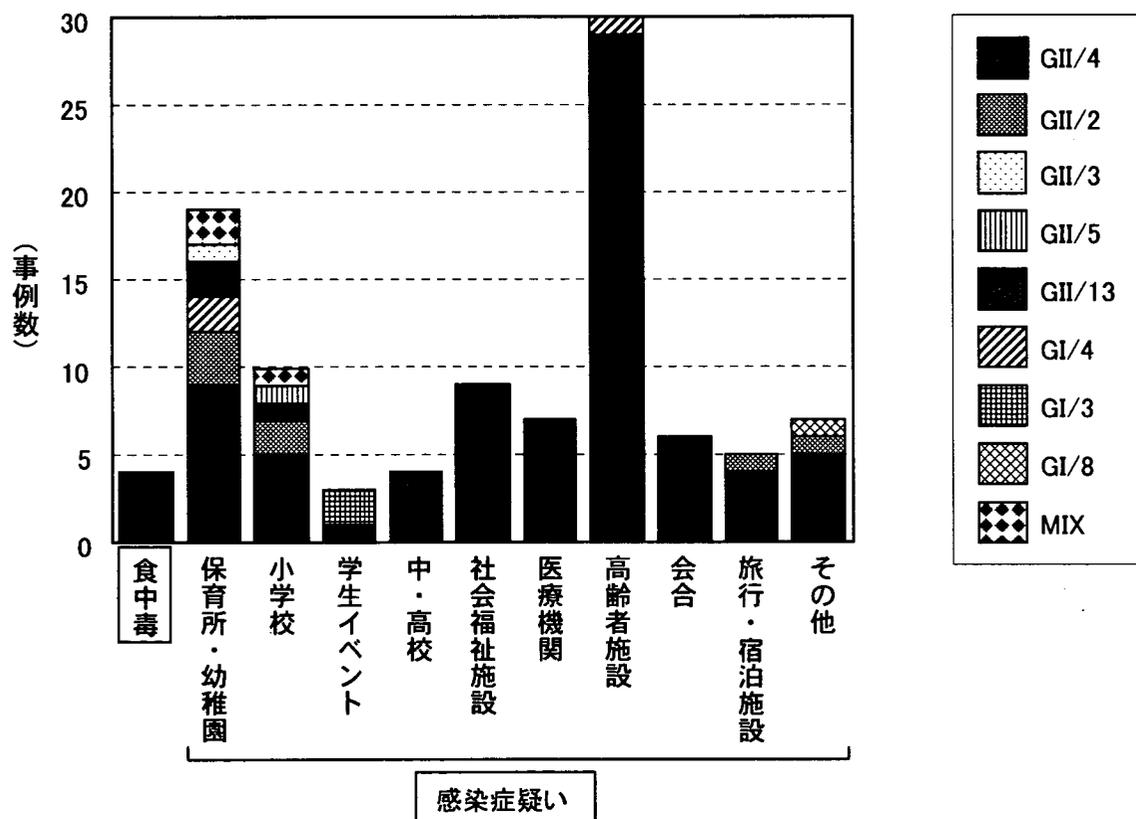


図3 2007/08 シーズンに検出されたノロウイルスの遺伝子型

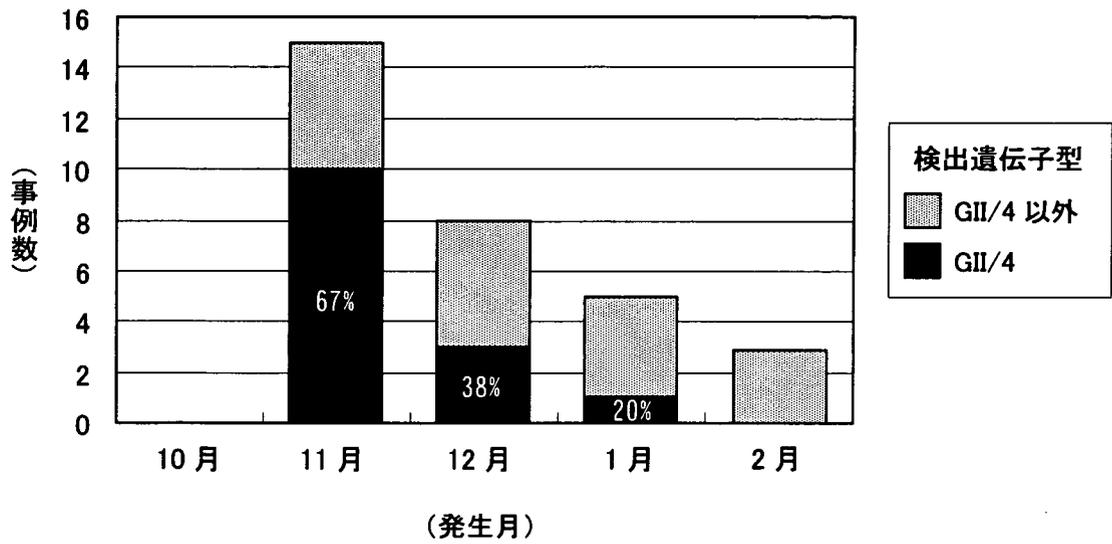


図4 保育所・幼稚園児及び小学生事例の月別発生数と GII/4 が検出された事例の割合

平成 19 年度厚生労働科学研究補助金（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」

協力研究報告書

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

研究協力者 三上 稔之 (青森県環境保健センター)
分担研究者 田中 智之 (堺市衛生研究所)
研究協力者 石川和子、熊谷邦彦 (青森県環境保健センター)

研究要旨：

2006 年 10 月から 2007 年 5 月までにノロウイルス (*Norovirus*: 以下 NV) による感染症及び食中毒疑い集団発生例は 38 事例で、得られた 895 検体、感染症発生動向調査に基づく病原体定点からの感染性胃腸炎患者便 57 検体、及び県外で感染した患者便 10 検体について NV 遺伝子検索を行った結果、集団発生例では 37 事例で NV genogroup II 型 (以下 NVG II) が、1 事例で NV genogroup I (以下 NVG I) と NVG II が検出された。また、感染性胃腸炎患者便 57 検体中 35 検体、県外で感染した患者便 10 検体中 9 検体からは、NVG II 遺伝子が検出された。遺伝子解析の結果、検出された NVG I は G I /7/AJ277609Winchester/94/Uk 類似株、NVG II はすべて G II /4/Bristol/93/UK (以下 G II /4) 類似株であった。G II /4 型株内の近縁性については、2006/07 シーズンの流行株は、2006 年に検出されている 281/2006/HK 香港株と AC3-1/2006/UK 英国株に最も近縁であった。

2007 年市販生カキの NV 汚染実態調査においては、10 月～12 月に購入した生カキ 18 パック内浮遊水 (Pack Water:PW-1～18) 18 検体と 18 パック内生カキ中腸腺 164 個を対象に実施し、18 パック (Pack:P-1～18) 中 4 PW から中腸腺 164 個中 6 個 (6P) の中腸腺から G I 又は G II が Nested PCR 及びリアルタイム PCR により検出された。

A. 研究目的

ノロウイルス (*Norovirus*:NV) による感染性胃腸炎及び食中毒は、年々増加傾向がみられ大きな社会問題となっている。特に 2006/07 シーズンは、例年より約 1 ヶ月程度早い 10 月中旬から全国各地の高齢者施設、福祉養護施設、病院、保育園、ホテル等での発生が確認された。また、感

染症発生動向調査事業においては、小児の感染性胃腸炎の報告数が本事業開始以来最も多い報告数であった。

青森県における NV の 2006/07 シーズンの発生状況は、九州、関西、関東地域に比し、発生時期が約 1 ヶ月遅れの 11 月からで、5 月まで確認された。各事例等から検出された NV は、遺伝子解析により株間及び遺伝子型

間の類似性及び近縁性について検討した。また、2007年市販生カキのNV汚染実態調査については、2007年10月～12月の市販生カキとパック内浮遊水(Pack Water:PW)を対象に実施し、生カキのリスク評価の基礎資料とする。

B. 研究方法と材料

1. 材料

2006年10月から2007年5月までの集団発生38事例から得られた895検体(糞便640検体、吐物11検体、食品125検体、ふきとり119検体)、感染症発生動向調査に基づく病原体定点(青森市、弘前市、むつ市)からの感染性胃腸炎患者便57検体、及び県外(東京、長野、福島、秋田)で感染した患者便10検体、また、2007年生カキNV汚染実態調査には、市販生カキを10月～12月に購入した18パック(中腸腺164個)及びパック内浮遊水18検体を用いた。

2. 方法

1). 検体処理

カキは中腸腺を10%乳剤にし、パック内浮遊水はそのまま10,000rpm、20分間冷却遠心後、上清に等量の20%ポリエチレングリコールおよび1MNaClを加え、4℃に一晚静置後、3,000rpm、20分間冷却遠心濃縮し、沈渣に滅菌蒸留水300 μ lを加え用いた。

2). RNA抽出と増幅

RNA抽出はQIAamp Viral RNA Mini Kit(Quiagen)により行い、cDNA合成は青森県環境保健センター研究報告に準じて実施した。NV遺伝子キャプシド領域の増幅は1stPCRにはCOG1F/G1SKR、COG2F/G2SKRプライマー及び2ndPCRにはG1SKF/G1SKRと

G2SKF/G2SKRプライマーを用いた。

リアルタイムPCRは、景山らの方法に準じ、COGF/RプライマーとRING-TPタックマンプローブをABI社のプリズム7000で測定した。

3). 遺伝子解析

NVの塩基配列は、QIAquick PCR Purification Kitで精製したPCR産物を、BigDye Terminator Kit(ABI PRISM)を用い、オートシーケンサーABI PRISM310(Applied Biosystems)で決定した。GII capsid 279塩基をClustal Wで比較し、281/2006/HK 香港株、Sakai/04-179/2005/JP 堺株、AC3-1/2006/UK 英国株を用いて近隣結合法により分子系統樹を作成した。

C. 研究結果

感染症及び食中毒疑い集団発生例の月別発生状況は、2006年10月1例、11月4例、12月12例、2007年1月、2月7例、3月1例、4月4例、5月2例であった(図1)。そのうち、食中毒例は12月に2事例、1月に1事例で他はすべて感染症事例であった。また、施設別発生として、高齢者施設12件、福祉養護施設9件、宿泊施設9件、保育園・幼稚園と病院各2件、飲食店1件、その他3件であった(図2)。集団発生の規模は、発症者3～10人6事例、11～20人16事例、22～38人9事例、40～65人5事例、119～121人2事例であった(表1)。

集団発生38事例の発症者便及び調理従事者便640検体中281検体、吐物11検体中2検体、食品125検体中10検体、ふきとり119検体中5検体からNV遺伝子が検出された。集団発生例での遺伝子型は、集団発生例中1例でNVGIとNVGIIが検出されたが、