

## 2. ウイルス検索

### 1) ノロウイルス検出と遺伝子解析

下水は、500ml をセルロース膜により濃縮した。その後、QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いてウイルス RNA を抽出し、カプシド系プライマーを用いて RT-PCR 法を行った。検出された増幅産物をサイクルシーケンス後、Genetic Analyzer 310 (ABI) を用いたダイレクトシーケンスにより塩基配列決定後、Katayama らの方法に従って系統解析を行った。

### 2) ノロウイルスの定量

QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いてウイルス RNA を抽出後、影山らの方法に準じて COGF/R 系プライマーと RING TaqMan Probe を用いたリアルタイム PCR 法を用いた。なお、NV RNA 量は下水流入水の 1ml あたりに換算し、実測値 10 コピー以下は定量限界値以下の未検出とした。

## C. 研究結果

### 1) ノロウイルスの検出状況

NV は下水流入水から GI 及び GII がいずれか、あるいは両方が 1 年を通じて検出された (表 1)。

下水流入水から検出された GI の遺伝子型は、GI/4 のみであり、大きく 2 つの系統に分けられた。一つは、HU/NLV/Valetta/9 系統であり、4 月及び 12 月を除く 1 月から 11 月まで検出された。この系統は昨年度も 9 月及び 10 月に検出されている。他方は、GI/4 Chiba407/87/JP 系統であり、2 月に検出されたが、昨年度は検出されていない。2006 年に検出された GI/2 (Southampton/91/UK 系統) 及び GI/8 (Shindlesham/95/UK 系統) は検出されていない。(表 1 及び図 1)。

GI ではなく GII では 5 種類の遺伝子型が検出された。最も多く検出された型は GII/4 で、2 月、6 月、10 月、11 月、12 月に検出された。この GII/4 は、大きく 3 つの系統に分けられた。一つは、昨年流行株であった Camberwell/94/AU 系統であり、2006 年シーズンに世界的に流行した変異株である 2006 及び 2006b 系統でひとつのクラスターを形成していた。残りは、この系統とは別々の系統に分けられた。GI/4 以外の遺

伝子型は、1 月に GI/13 (M7/99/US 系統)、3 月に GI/7 (Lees/90/UK 系統)、4 月に GI/5 (Hillingdon/90/US 系統)、7 月に GI/2 (SnowMountain/96/US 系統) がそれぞれ検出された。2006 年検出された GI/3 (Arg320/98/AR 系統) は検出されなかった (表 1 及び図 2)。

### 2) ノロウイルスの定量

GI における流入水中の NV RNA 量は  $10^{1.7} \sim 10^{2.6}$  copy/ml であり、流行間期である 6 月に  $10^{2.2}$  copy/ml、7 月に  $10^{1.7}$  copy/ml が検出された。GI には  $10^{2.2} \sim 10^{3.9}$  copy/ml であり、GI に比較して多い傾向であった。GI と同様に流行間期である 6 月に  $10^{2.6}$  copy/ml が検出された (表 1)。

GI、GI ともに流行期以外では、定量限界値以下であった調査月が多かった。

### 3) 昨年度の調査との比較 (9 月～12 月)

GI の遺伝子型は 2007 年では、すべて GI/4 であったが、2006 年では GI/4 に加えて GI/2 及び GI/8 型が検出されている。GI の遺伝子型は 2007 年、2006 年ともにすべて GI/4 であった (表 2)。

NV RNA 量は、2007 年及び 2006 年ともに GI に比し GII が高い傾向にあった。流行前の 9 月で比較すると、GI は 2007 年には  $10^{2.5}$  copy/ml が検出されたが、2006 年は定量限界以下であった。一方、GI は 2007 年では検出されなかったが、2006 年  $10^{2.7}$  copy/ml が検出されている (表 2)。

### 3) 急性胃腸炎 (感染性胃腸炎) 患者発生状況とウイルス検出状況

集団発生患者は県外事例 4 事例及び国外修学旅行事例 2 事例 (オーストラリア、中国) を含む 25 事例のうち、佐賀県内発生の中食中毒と確定された事例は、12 月の旅館事例の 1 事例のみであった (表 3)。

集団発生施設は、社会福祉関係施設が多く、病院内感染事例もみられた。その NV 検出状況はほとんどの事例から GII/4 が検出された。これらの NV は発症者の糞便からばかりでなく、症状がない、いわゆる不顕性感染者や嘔吐物からも検出された。また、吐瀉物で汚染された廊下やトイレのドアノブ等のふき取りからも検出された。

佐賀県の散発患者報告数は、2007 年では 11 月初旬 (45 週) から急速に増加しはじめ

て12月上旬(第49週)にピークを迎え、その後、急速に減少した。このパターンは2005年とほぼ同様であり、患者数もほぼ同じ定点あたり報告数で約30人であった

2006年はやや早く10月下旬(第43週)から立ち上がり、11月初旬(46週)にピークを迎え、その患者数は2007年及び2005年の約1/3であった。

3月にロタウイルスによると思われるピークがみられている。全国の散発患者報告数は、佐賀県の立ち上がり に比してやや遅く、患者数も少ない傾向にあったが、2006年は過去最高となり、そのピークは佐賀県よりも高くなっている(図3)。

NV検査数は39検体で、1月に2検体からGII/13が検出された。11月以降は11検体からGII/3及びGII/4が検出され、1株のみがGII/3であった。

#### D. 考察

食中毒を含むNVに起因する急性胃腸炎はヒトへの感染効率が非常に高い経口感染症であり、毎年冬季に流行する。NV感染はカキ等の汚染食品の喫食に加えて、最近、感染者の嘔吐物・糞便から手指や飛沫を介する、いわゆるヒト→ヒト感染が注目されている。また高齢者入居の社会福祉施設での死亡例が報告され、社会問題ともなっている。

今回、調査した下水処理場における1年間の流入水中のNVは、夏期を含めてすべての調査月から検出されており、「ヒト→下水(下水処理場)→河川→海水→カキ→ヒト」の感染環が推定された。また食中毒の1事例以外の集団発生事例は、嘔吐物、あるいはトイレのドアノブ等のふき取りからNVが検出されことから「ヒト→ヒト」の感染を強く示唆する。

下水からのNV検出状況と流入水上流域の患者発生をGenogroup別に比較すると、GIとGIIでは検出状況が異なっており、ウイルス側の要因、宿主側の要因が考えられる。

GIではGI/4が下水流入水からほとんど毎月のように検出されたにもかかわらず、散発患者数の変動がほとんどなく、集団発生事例は2事例のものであったことからGIによる感染は不顕性感染が多い可能性や症状が軽く、経過して患者として報告・集計されなかった

ことも考えられる。

GIIでは、GII/4が流行期において2007年、2006年ともに11月及び12月に集中的に検出されたこと、下水流入水中のウイルスRNA量は散発患者報告数の増加とほぼ平行したことから上流域の感染状況を反映している。またウイルスRNA量の増加は散発患者報告数の急増に先行し、患者数予測の指標になりえることを示唆する。この散発患者報告数の急増の時期は、2006年シーズンに世界的に流行した変異株である2006及び2006b系統とは別の系統が出現しており、ウイルス変異等により感染効率が増した可能性がある。6月及び7月の流行間期におけるGIIの検出は、GI場合と同様に不顕性感染の存在を示唆する。特にGII/4の場合、6月に検出された株と流行期に検出された株が同じクラスターであったことから推定される。

以上から、下水流入水中のNV検出状況は、上流域の急性胃腸炎の流行状況を反映しており、この結果は散発患者発生の状況に加えて、住民への衛生管理の徹底を促す注意報発令の資料となると考えられる。

今後、検出されたNVの遺伝子変異の検討を含めてさらに調査を進めていきたい。

#### E. 結論

- 1 平成19年9月から12月まで12回、下水流入水におけるNVの消長調査を行った結果、流入水からNVは調査期間中、流行間期である夏期を含めて検出された。
- 2 NV量は患者報告数の急増に先行して増加し、GIIがGIと比較して多い傾向にあった。
- 3 検出された遺伝子型は、GIではすべてGI/4であり、GIIではGII/2、GII/4、GII/5、GII/7、GII/13の5種類が検出された。
- 4 GII/4は流行期を含め最も多く検出され、2006年世界的に流行した変異株系統を含め3つの系統を検出した。
- 5 これらの状況は、上流域のNV感染状況をよく反映しており、現行の感染症発生動向調査報告患者数に加えて、住民への衛生管理の徹底を促す注意喚起の資料となり得る。

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 下水流入水におけるノロウイルスのRNA量及び遺伝子型(2007年)

	G I		G II	
	RNA定量*	遺伝子型	RNA定量	遺伝子型
1月	1.9	G I / 4	3.3	G II / 13
2月	2.6	G I / 4	3.5	G II / 4
3月	-**	G I / 4	-	G II / 7
4月	-	-***	2.2	G II / 5
5月	-	G I / 4	-	-
6月	2.2	G I / 4	2.6	G II / 4
7月	1.7	G I / 4	-	G II / 2
8月	-	G I / 4	-	-
9月	2.5	G I / 4	-	-
10月	-	G I / 4	2.7	G II / 4
11月	2.2	G I / 4	3.0	G II / 4
12月	-	-	3.9	G II / 4

\* RNA定量: ウイルスRNA copy/m (対数表示)、\*\*-は定量限界(実測値10コピー)以下

\*\*\*遺伝子型: -は検出せず

表2 下水流入水中のノロウイルスのRNA量及び遺伝子型  
(2006年、2007年:9月~12月)

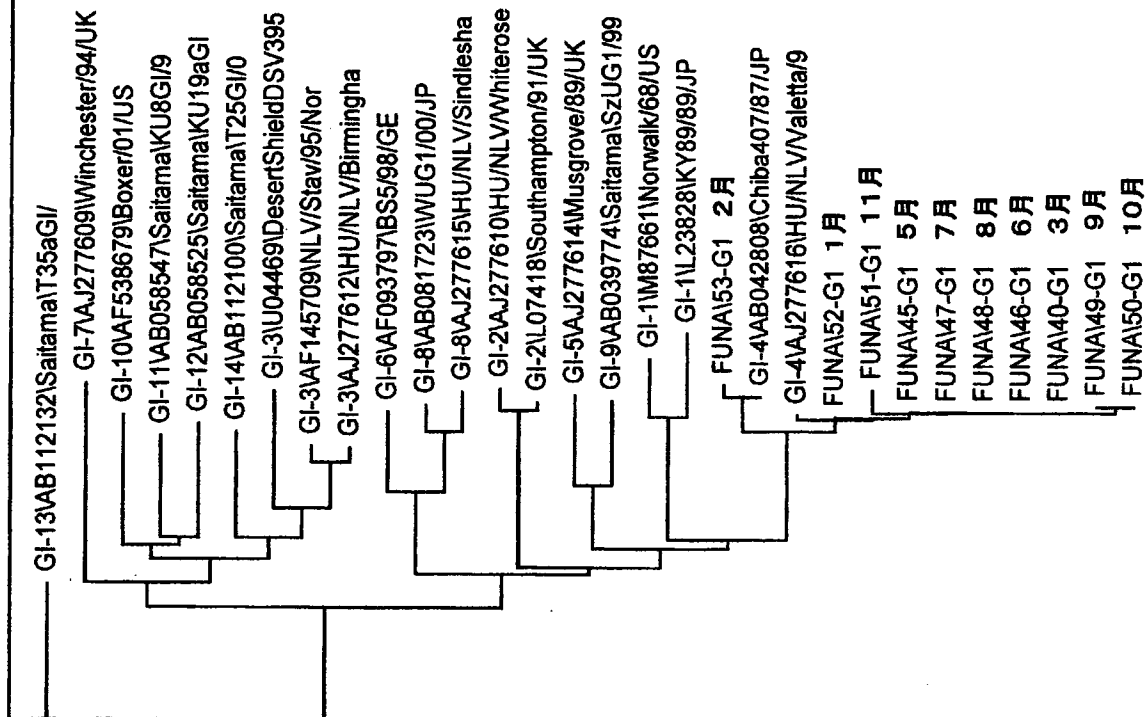
群別	採取月	RNA定量*		遺伝子型	
		2006年	2007年	2006年	2007年
GI	9月	-**	2.5	GI/4	GI/4
	10月	-	-	GI/4	GI/4
	11月	2.5	2.2	GI/2****	GI/4
	12月	2.5	-	GI/8	-
GII	9月	2.7	-	GII/4	-***
	10月	2.7	2.7	GII/4	GII/4
	11月	3.7	3.0	GII/4	GII/4
	12月	3.7	3.9	GII/4	GII/4

RNA定量:ウイルスRNA copy/m(対数表示)、\*\*-は定量限界(実測値10コピー)以下を示す。  
\*\*\*:遺伝子型:-は検出せず、\*\*\*\*GI/4も検出されている。

表3 ノロウイルス集団発生事例の概要(2007年)

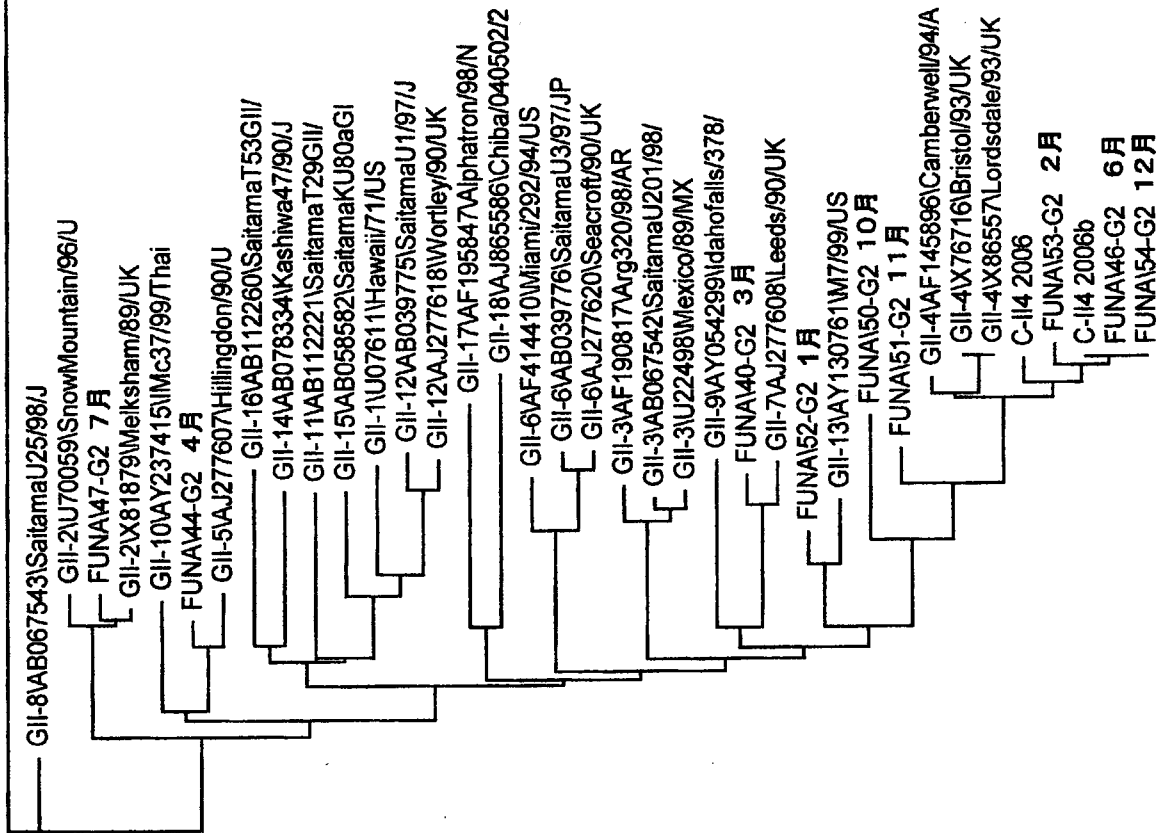
事例番号	発生日	発生場所	全体数	患者数	患者	検査数(陽性数/検体数)		遺伝子型
						職員**	拭取り	
1	1月10日	高齢者福祉施設	75	22	3/3			GI/4
2	1月30日	ホテル(県外)	130	10	2/2			GI/4
3	1月31日	高校修学旅行(オーストラリア)	246	58	20/24			GI/4
4	2月1日	ホテル(県外)	397	147	2/3			GI/4
5	3月9日	高齢者福祉施設	50	9	5/8	0/2	0/2	GI/4
6	3月13日	高齢者福祉施設	80	23	3/4			GI/4
7	3月20日	児童養護施設	70	14	2/2	1/3		GI/5
8	5月16日	小学校	398	63	3/9	2/5	0/2	GI/4
9	7月13日	障害者援護施設	50	13	2/2	3/3		GI/4
10	11月11日	高校修学旅行(中国)	202	53	9/9			GI/3
11	11月20日	高齢者福祉施設	106	16	4/4		2/2	GI/4、GI/4
12	11月28日	飲食店	16	10	1/12		0/1	GI/4
13	11月29日	観光バス内	40	17	7/7			GI/4
14	11月29日	保育施設	105	30	2/2		1/1	GI/4
15	11月30日	イベント会場	600?	44?	9/19		0/5	GI/4
16 *	12月4日	宿旅館(患者は県外)	659	118		5/9	0/1	GI/4
17	12月6日	旅館(県外)	197	59	10/11			GI/4
18	12月10日	総合病院	?	35	3/3			GI/4
19	12月11日	旅館	62	18	4/5	1/8		GI/4
20	12月12日	飲食店	38	22	2/2	4/6		GI/4
21	12月13日	障害者援護施設	75	26	2/2			GI/4
22	12月19日	障害者援護施設	70	10	3/3			GI/4
23	12月21日	高齢者福祉施設	21	7	2/2			GI/4
24	12月22日	高齢者福祉施設	30	10	3/4			GI/4
25	12月27日	障害者援護施設	22	16	3/3			GI/4

\*事例16は食中毒事例、\*\*職員は調理従事者を含む



0.1

図1 下水流入水から検出されたノロウイルスG1の分子系統樹



0.1

図2 下水流入水から検出されたノロウイルスGIIの分子系統樹



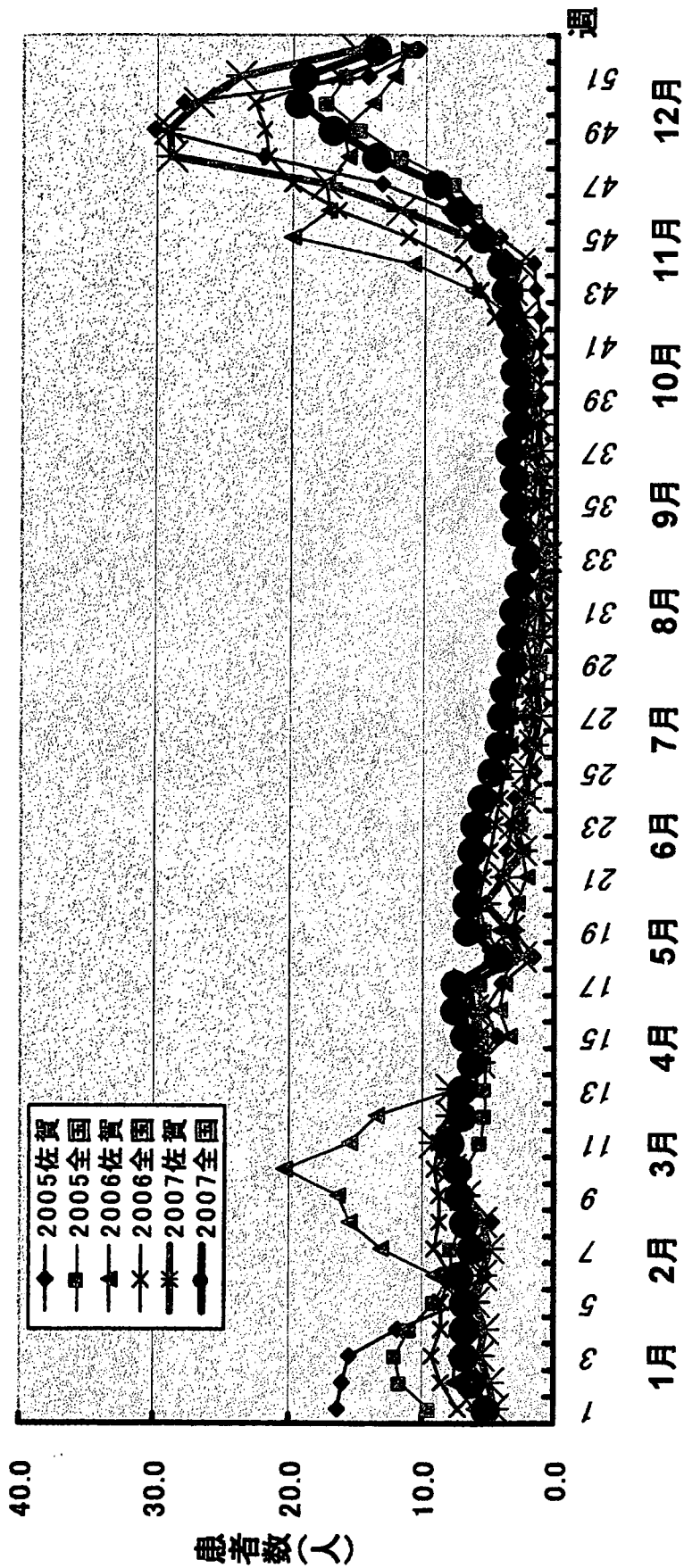


図3 定点あたりの感染性胃腸炎患者報告数の推移(2005年~2007年: 佐賀、全国)

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）

「ウイルス性食中毒の予防に関する研究」班

研究協力報告書

## 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）－

研究協力者 松岡 由美子 （熊本市環境総合研究所）  
分担研究員 田中 智之 （堺市衛生研究所）  
研究協力者 森田 美加 （熊本市環境総合研究所）  
川本 大輔 （福岡市保健環境研究所）  
平野 敬之 （佐賀県衛生薬業センター）  
小河 正雄、田代 潔子、長岡 健朗（大分県衛生環境研究センター）

### 研究要旨：

2007 年 1 月から 2007 年 12 月までに、胃腸炎集団感染事例 83 事例（うち食中毒 8 事例）、発生動向調査 69 検体からノロウイルスが検出された。遺伝子解析の結果、遺伝子型としては、前年度に続き、GII/4 が大多数を占めた（集団発生 90%、発生動向調査 81%）。検出された GII/4 は、109 株が 2006 b variant、4 株が 2006 a variant であった。2006-2007 年シーズンにみられた全国的流行の次のシーズンでも、胃腸炎集団感染事例は、2005-2006 年シーズンより多く発生していたが、発生動向調査の検体数は減少していた。

### A. 研究目的

急性胃腸炎の主要ウイルスの一つであるノロウイルス（NV）は、数年ごとに遺伝子型 Genogroup II, Genotyp 4 (GII/4) の一部が変異し、同遺伝子型の NV による大流行を起こすことが解ってきた。2006 年 10 月から 12 月にかけて、NV の大流行が全国的に報じられた。通常大流行の次の年は、NV の流行は少ないといわれる。しかし、感染症情報センターの感染性胃腸炎全国統計では、2007 年 10 月からのシーズンに、九州では例年通りの発生状況となった。この結果 2006 年よりも定点当たり患者数が多く、全国平均よりも多かった。

本研究所では、九州内 4 自治体で検出された NV の遺伝子型別比較を行い、2005-2006、2006-2007 の状況と、2007-2008 シーズンの胃腸炎集団感染事例及び、発生動向調査検体での発生状況調査と遺伝子型別の推移を調査した。

### B. 研究材料と方法

#### 1、検査材料

2007 年 1 月から 2007 年 12 月の期間に、4 自治体へ行政検査依頼があった、胃腸炎集団感染事例に関連して採取した 828 検体（糞便 749 検体、ふきとり 46 検体、食品 24 検体、吐物 7 検体）および発生動向調査検体の糞便 69 検体を検査材料とした。また、収去等で搬入された生カキ 54 検体も検査材料とした。

#### 2、検査方法

平成 15 年 11 月 5 日厚生労働省食安監発第 1105001 号「ノロウイルスの検査法」に準じて RNA 抽出及び、検出を行った。検出には、PCR 法およびネステッド PCR 法又は、リアルタイム PCR 法を用い、リアルタイム PCR 法のプライマーは、COG1F/COG1R 及び COG2F/COG2R、プローブは、それぞれ RINGG1-TPa 及び RINGG1-TP b、RING2AL-TP を用いた。NV 陽性になった検体の遺伝子型別は各 4 施

設で行った。使用したプライマーは、COG1F/G1SKR、COG2F/G2SKR、G1SKF/G1SKR 又は G2SKF/G2SKR で、増幅産物はダイレクトシーケンス法により片山らの方法にしたがって決定した。また、GII/4 のみの系統樹作成も行ったが、対象株として、既報 (J. Virology. Vol. 81. No18. P9932-9941) の OB2006070 株 (2006a variant) 及び OB2006115 株 (2006b variant) を標準株に加えた。系統樹解析は Clustal X を用いた近隣結合法により行った。

## C. 研究結果

### 1. NV 流行の把握

表 1 に 2005、2006、2007 年の 4 自治体における感染性胃腸炎の定点あたりの患者数を示した。2007 年シーズンは、2006-2007 年シーズンの、NV の全国的流行のあとであるため患者発生数が少ないと予測されたが、4 自治体では、昨年定点あたり患者数を、大きく上回った。2006 年には、42 週から定点あたりの患者報告数が増加していたが、2007 年は、45 週から定点あたりの患者数が増加した。また、2006 年は定点あたりの患者数が 20 を超えたのは、大分県だけであり、最高値は、47 週の 28.06 人であったが、2007 年は、大分県の定点あたり患者数は、49 週目で 43.56 人であった。

### 2. NV の検出状況

2007 年 1 月から 12 月に 4 自治体の胃腸炎集団感染事例の行政検査依頼で、NV が検出されたものは、83 事例であった。発生動向調査検体は、69 検体から NV が検出された、56 検体で遺伝子解析が終了した。胃腸炎集団感染事例の 83 事例では、3 事例で複数の遺伝子型が検出された (GII/2+GII/4、GII/3+GII/4、GI/7+GI/10 等 5 種類)。この事例は 2007 年 12 月の事例であった。その他の検出された NV のほとんどは、GII/4 であった。(発生動向調査検体 81%、集団感

染事例 90%) (図 2)。2007 年 1-3 月に GII/13 が発生動向調査検体などで検出された (図 3)。しかし、この遺伝子型は、2007 年 10 月から流行する遺伝子型とはならなかった。

食中毒事例は 1-12 月の間に 8 事例あった。7 事例が GII/4 の NV による食中毒で、6 事例は推定原因食品が不明であった。1 事例は殻つき牡蠣が推定原因食品であったが、食品残品はなく、食品の検査はできなかった。また、患者から検出された遺伝子型は、GI/7、GI/10、GI/14、GII/13 などであった (表 1)。

収去検体の牡蠣等からの NV 検出は 3 自治体で行われており、54 検体中 4 検体から NV が検出された。遺伝子型が決定できた 2 検体 GII/3 であった。

ふきとり検体の検査は、熊本市では年度計画の中で定期検査として、佐賀県では、集団発生があった施設からの検査が行われた。

熊本市では、3 施設、15 検体について検査を実施した。結果はすべて陰性であった。一方、佐賀県の施設内調査は、7 施設 19 検体中、3 施設 4 検体が NV 陽性であった。

### 3. GII/4 のサブタイプ分類

胃腸炎集団事例及び発生動向調査の検体から検出された NV で、GII/4 であった 117 株について、GII/4 の標準株と系統樹を作成した。その結果、109 株が OB2006115 株 (2006b variant) と近縁な株であることがわかった。また、4 株は OB2006070 株 (2006a variant) と近縁であった。残り 4 株については、系統樹上での位置から、再解析の必要があった (図 4)。

2006a variant 及び 2006b variant は 2006 年 10 月以降から検出されていた。

### 4. 2005 年-2007 年の比較

2007 年 12 月までのデータの比較では、集団感染事例数は 2006-2007 年シ

ーズン>2007-2008年シーズン>  
2005-2006年シーズンの順であった。

(表3)。また、集団感染事例の遺伝子型は、2005-2006年シーズンについては、GI/4、GI/8、GI/14、GII/2、GII/3、GII/4、GII/6、GII/2+GII/3+GII/4混合型など、遺伝子型別出来たもの8種と、遺伝子型別の出来なかったGIIがあった。

一方、2006-2007年シーズンは、90%がGII/4であり、その他にGI/4、GII/5、GII/13が検出された。

食中毒事例では、2005-2006年シーズンには、数種類の遺伝子型が検出される事例が14事例中6事例あった。2006-2007年シーズンでは遺伝子型別の出来なかった1事例を除き、12事例全てGII/4型であった(表1)。2007-2008年シーズンは、2事例発生し、内1事例はGII/4型、1事例は混合型であった。

#### D. 考察

2006-2007年シーズンにノロウイルスの全国的流行があったため、2007-2008年シーズンでは、大流行はないと予想されていたが、国立感染症研究所の感染性胃腸炎の定点当たり患者数は、大分県、佐賀県、熊本市では、2006年よりも多くの報告があった。このことは、2006年は、国立感染症研究所が中心となって注意喚起を行い、厚生労働省も早くから各施設への通知を出していたため、最終的に流行の終息が早かったことも考えられた。しかし、情報の性質上、感染性胃腸炎イコールNVではなく、今回の全国成績と比較して、九州でのNV流行が大きかった原因については、多面的な解析が必要であると考えられた。

GII/4のNVが2006-2007年シーズンに続き、2007-2008年シーズンも主流であった。GII/4のNVが胃腸炎集団感染事例、発生動向調査検体の過半数

を占めていた。

牡蠣の収去検査でNVが検出されることは少なく、また、2007年1月に検出されたNVの遺伝子型は、GII/4が大流行していた時期にもかかわらず、GII/3であった。この時期でも、GII/3がヒトの間で循環していたと考えられた。

ふきとり検体の検出には、事例発生時には汚染確認の指標になると考えられるが、感度を高めるための検出法の統一等の検討が必要であると考えられた。

#### E. 結論

1. 九州4都市では、2006-2007年シーズンの全国的にGII/4が流行した後の次シーズンにもGII/4の流行は続いていた。
2. 2007.1月から12月に検出されたGII/4は、2006bvariantに属するものが109株。2006a variantに属するものが4株であった。
3. GII/4が流行する前の2005-2006年シーズンでは、GI/4、GI/8、GI/14、GII/2、GII/3、GII/4、GII/6、など7種類の遺伝子型の株が流行していた。

#### F 健康危機情報

なし

#### G 研究発表

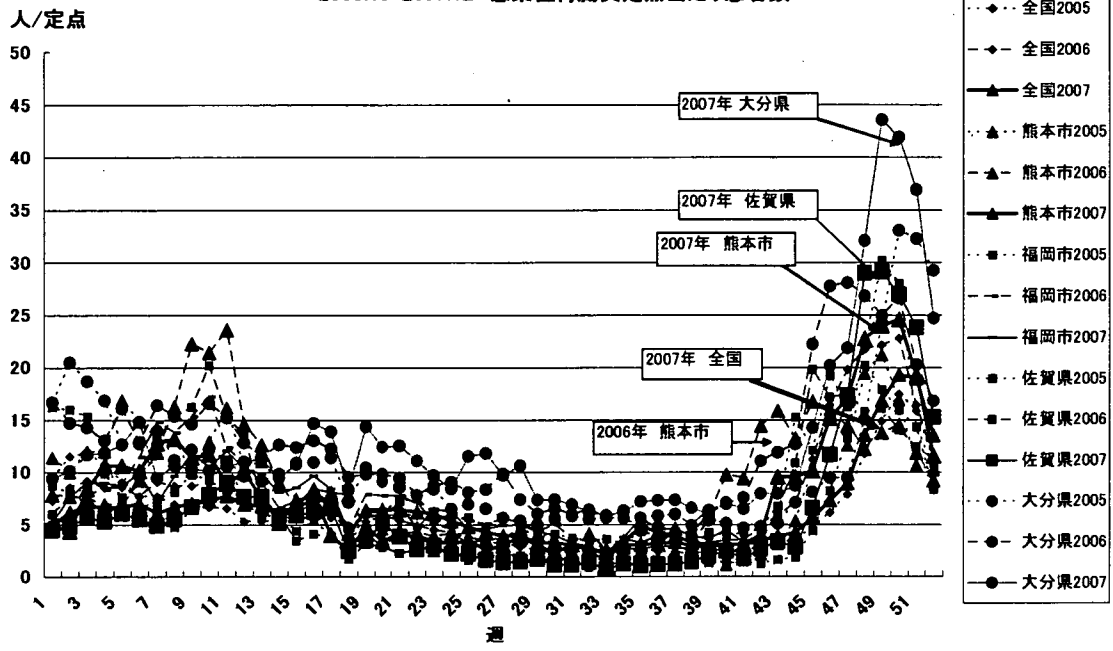
なし

#### H 知的財産権の出願、登録状況

なし

(表 1)

2005.10-2007.12 感染性胃腸炎定点当たり患者数

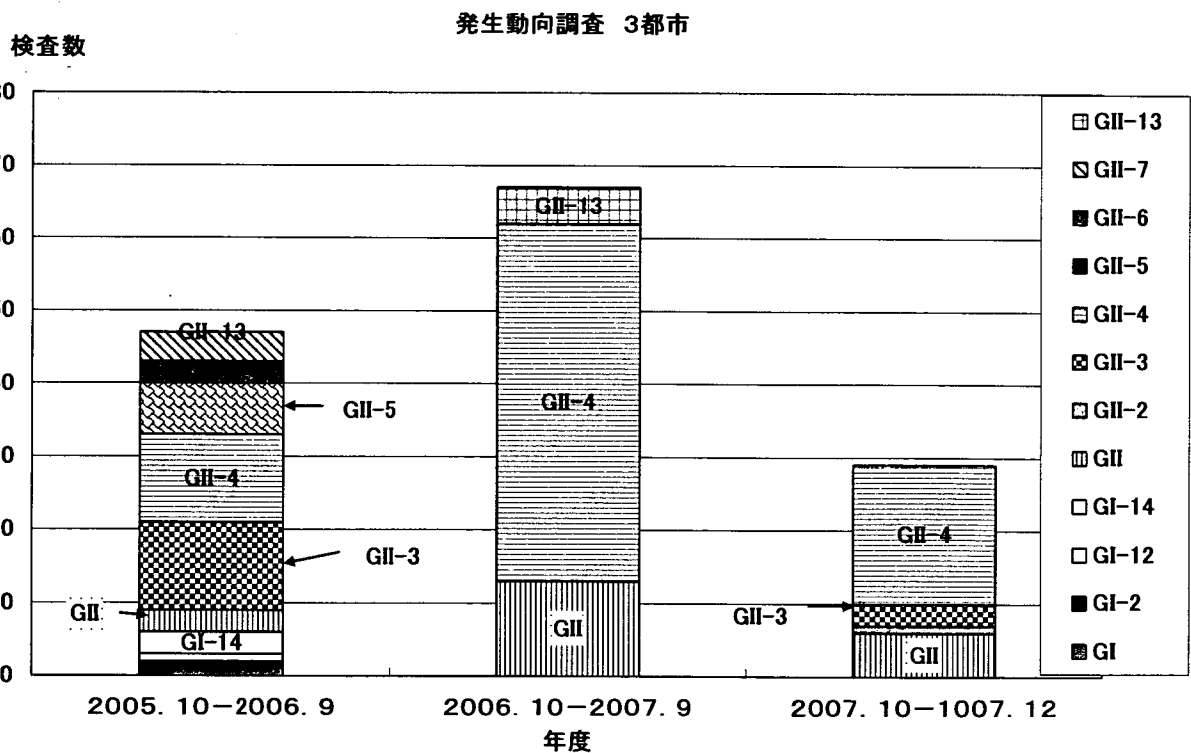
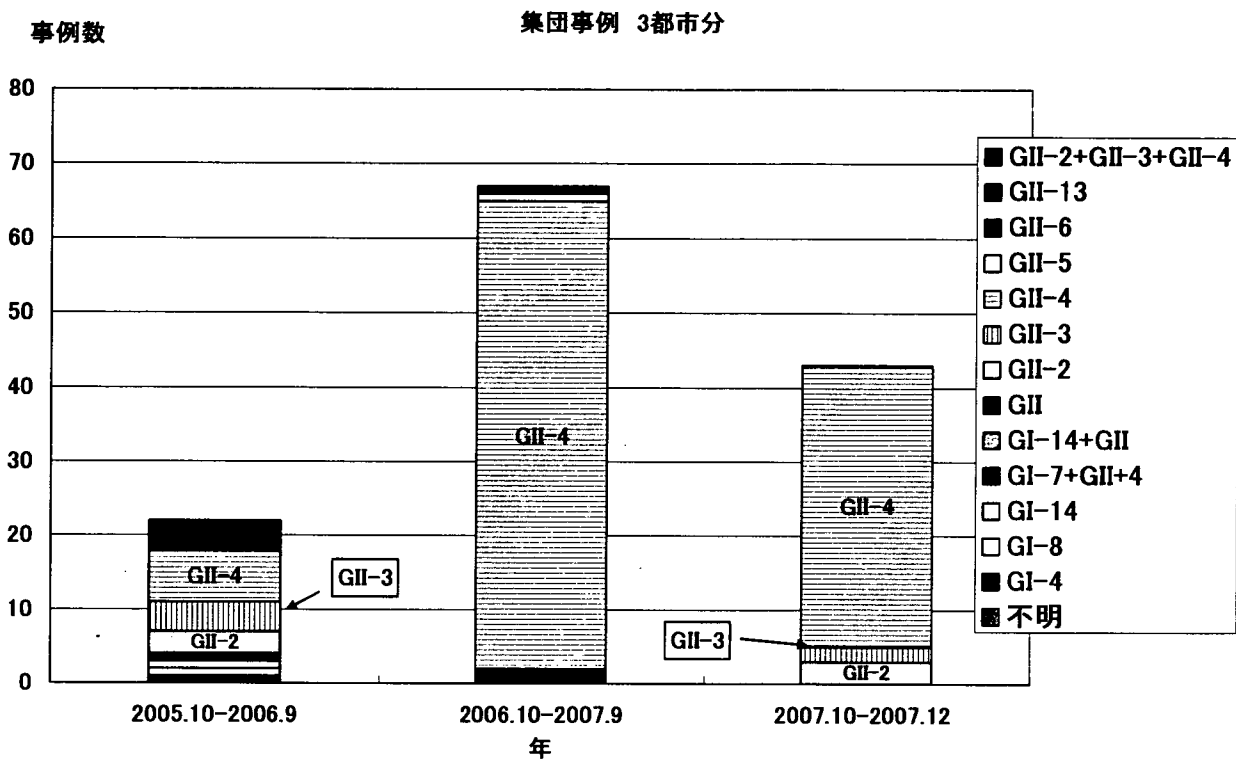


(表2) 2005年10月から2007年12月に発生した  
NVが原因となった食中毒事例

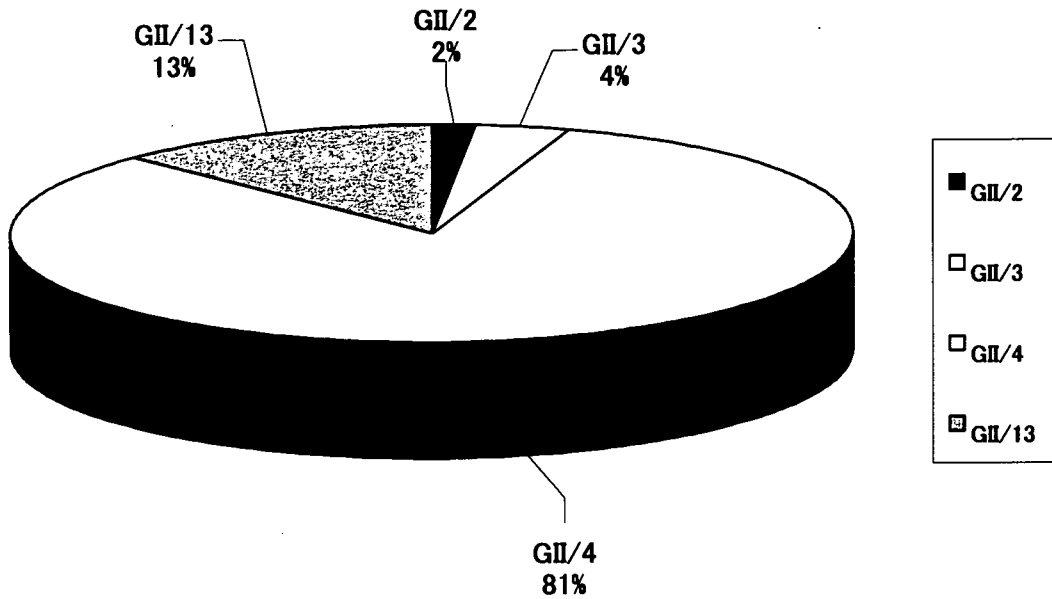
No	発生日	発生施設	発生場所	推定原因	喫食者数	患者数	検査数	NV陽性数	遺伝子型	備考
1	2005/10/18	飲食店	大分県	不明	21	16	15	8	GI-3, GII-3, GII-4, GII-6, GII-12	
2	2005/12/29	国民宿舎	福岡市	不明	334	16	6	6	GII-4	
3	2006/1/13	飲食店	福岡市	不明	15	5	11	5	GII-3・6	
4	2006/1/20	飲食店	福岡市	焼きガキ	5	3	3	3	GII-12	
5	2006/2/2	飲食店	大分県	酢カキ	22	15	3	3	GI-4, GI-14, GII-3	
6	2006/2/3	飲食店	福岡市	生カキ	7	5	3	1	GII	
7	2006/2/4	修学旅行	福岡市	不明	185	76	10	9	GII-6	
8	2006/2/14	仕出し屋	大分県	不明	97	50	16	13	GII-3	
9	2006/2/20	旅館	熊本市	不明	62	51	43	22	GII-4	
10	2006/3/16	仕出し屋	大分県	精進料理	55	19	10	5	GII-3	
11	2006/3/20	飲食店	福岡市	酢カキ ぞうすい	18	15	7	4	GI+II	
12	2006/3/27	飲食店	大分県	会席料理	47	21	5	2	GI-14	
13	2006/4/4	仕出しや	福岡市	不明	38	27	15	5	GI-8	
14	2006/4/22	飲食店	大分県	不明	26	19	5	5	GI-2, GI-8, GII-1, GII-5, GII-16	
15	2006/10/2	弁当	熊本市	弁当	67	37	33	10	GII-4	
16	2006/10/31	飲食店	熊本市	飲食店の食事	46	24	15	10	GII-4	
17	2006/11/10	飲食店	大分県	会席料理	21	19	4	4	GII-4	
18	2006/11/16	飲食店	大分県	不明	14	13	8	5	GII-4	
19	2006/11/20	仕出し屋	大分県	仕出料理	47	23	8	7	GII	
20	2006/11/30	ホテル	佐賀県	和食料理	226	82	26	7	GII-4	食品4検体からの検出0
21	2006/12/5	飲食店	大分県	不明	50	25	11	10	GII-4	
22	2007/1/13	病院	福岡市	不明(病院給食)	97	47	6	6	GII-4	
23	2007/2/6	飲食店	大分県	不明	36	25	7	6	GII-4	
24	2007/2/7	飲食店	福岡市	不明(会席料理他)	25	19	15	14	GII-4	
25	2007/2/12	飲食店	福岡市	不明	19	16	10	8	GII-4	
26	2007/3/21	飲食店	福岡市	不明	55	24	5	3	GII-4	
27	2007/5/23	飲食店	大分県	弁当・会席料理	48	42	9	6	GII-4	
28	2007/12/4	旅館	佐賀県	不明	659	118	15	5	GII-4	
29	2007/12/25	飲食店	熊本市	殻つき牡蠣	12	10	11	9	GI-7, GI-10, GI-14, GII-13, GII-15?	加熱調理用牡蠣の生食

推定原因食品が判明したもの(食品からのNV検出は出来ていない。)

(表 3)



発生動向調査 遺伝子型



胃腸炎集団感染事例 遺伝子型

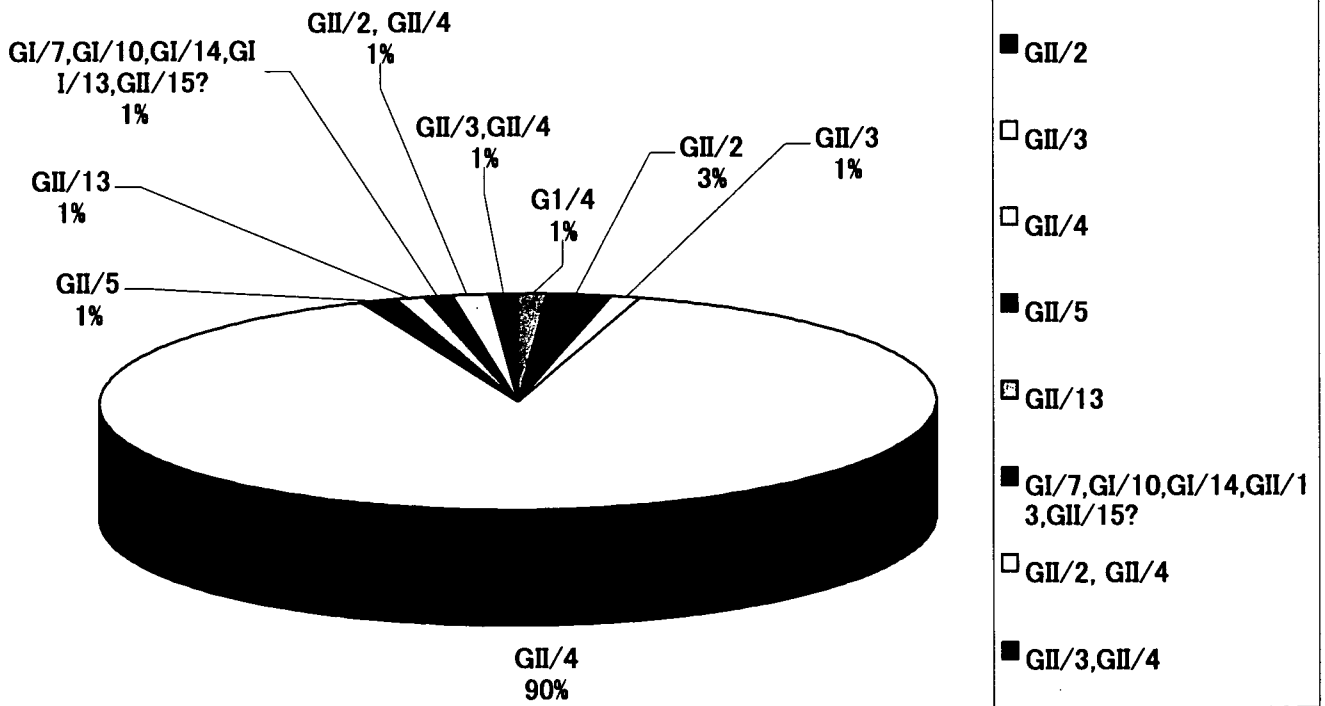


図1 発生動向調査、及び胃腸炎集団感染事例の遺伝子型 (2007. 1-12)



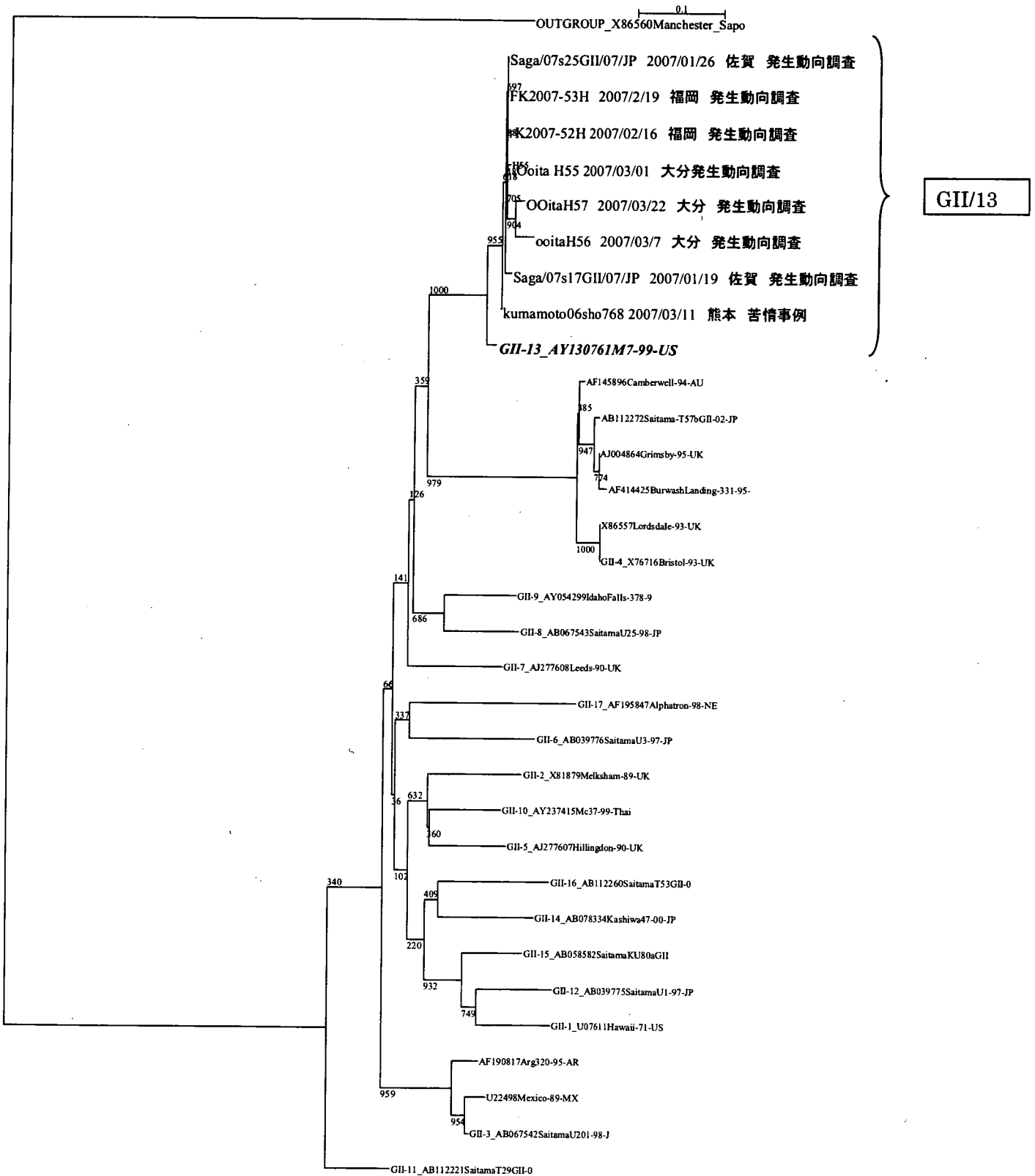


図2 九州4自治体で検出されたGII/13 NV Capsid 領域 系統樹 (NJ法)



## サポウイルスに対する単クローン抗体の作製とその有用性

研究協力者 北元憲利 (兵庫県立大学環境人間学部)  
分担研究者 田中智之 (堺市衛生研究所)  
研究協力者 李天成、白土東子、Grant S. Hansman、武田直和  
(国立感染研・ウイルス第 II 部)

### 研究概要：

サポウイルス (SV) は、ノロウイルス (NV) 同様に人の急性胃腸炎ウイルスであり、食中毒原因ウイルスである。SV には遺伝子学的な検出法はあるものの免疫学的な診断法が確立されているとはいいがたい。SV の簡便・迅速・経済的・多検体が検出可能な診断法を開発する目的で、SV-VLPs に対する MAbs の作製を試み、その結果、GI/1 に対して 5 クローン、GI/5 に対して 5 クローン、GII/3 に対して 3 クローン、GIV/1 に対して 6 クローン、および GV/1 に対して 10 クローンを得ることができた。これらの MAbs は、ほとんどが株特異的であった。しかし、genogroup (GI) に特異的と考えられるいくつかの MAbs も得られた。また、すべての genogroup に交叉する MAbs を 2 つ得ることができた。現在、これらの交叉性を示す MAbs についてさらに解析を行い、さらに、臨床材料を用いた MAbs の有用性、SV の抗原的解析、SV 検出 ELISA 法やイムノクロマト法の検出系の開発を試みている。

### A. 研究目的

ノロウイルス (Norovirus, NV) 感染の診断法として、現在、免疫学および遺伝子学的診断法が利用されている。両者を比較した場合、遺伝子学的方法 (PCR 法) は、感度および特異性の点で優れており、リアルタイム PCR 法は、かなり迅速性も増してきてはいるが、操作が煩雑で手間と技術が必要とされ、試薬も高価である。一方、免疫学的方法は、特異性や感度の点で遺伝子学的方法にはやや劣るものの、迅速、簡便で経済的にも優れ、多検体が同時に検出できるスクリーニングなどに適し

ている。この免疫学的手法に単クローン抗体 (MAbs) を利用すれば、より特異性が高くなることが期待される。

これまで、ノロウイルス様粒子 (NV-VLPs) に対する MAbs をいくつか作製し、ウイルスの抗原学的解析に応用するとともに、MAbs の特性を生かした NV-ELISA 法やイムノクロマト (NV-IC) 法による診断法の開発を手がけてきた。

一方、サポウイルス (Sapovirus, SV) も頻度は低いものの、感染性胃腸炎の重要な原因ウイルスとして知られおり、ここ数年発症事例の報告が増えている。SV の遺伝子学的な検出法はあるもの

の、免疫学的な診断法が確立されているとはいいがたい。そこで、今回はSVの簡便・迅速・経済的・多検体検出可能な診断法を開発するに必須なSV-VLPsに対するMAbsの作製を試みた。

## B. 材料と方法

免疫源として、バキュロウイルスで発現されたりコンビナントSV-VLPsを用いた。すなわち、GI/1 (Mc114株)-、GI/5 (Yokotel株、秋田県健康環境センター・斎藤博之先生により提供)-、GII/3 (Syd53株)-、GIV/1 (Syd3株)-およびGV/1 (NK24株)-VLPsを用いた。VLPsはいずれも国立感染研より分与された。定法に従いBalb/cマウスに経口あるいは腹腔投与を行い、細胞融合法を行った。抗体陽性細胞のスクリーニングは、免疫源を固相化したELISA法にて行った。各VLPsに対する交叉性は、ELISA法およびウエスタンブロット法にて検討した。

## C. 結果

今回、GI/1に対して5クローン、GI/5に対して5クローン、GII/3に対して3クローン、GIV/1に対して6クローン、GV/1に対して10クローンを得ることができた。GI/1、GI/5、GII/3、GIV/1およびGV/1を固層化したELISA法により各MAbs (培養上清)の反応性を調べたところ、交叉反応性の異なるMAbsが存在した (表1)。

### 1) 株特異性のMAbs

ほとんどのMAbsが株特異的であった。特に、GV/1に対する10MAbsは、免疫源であるGV/1とのみしか反応せず、すべて株特異性であった。

### 2) Genogroup特異的MAbs

GI/1に対するMAb 1325およびGI/5に対するMAb 616は、GI/1およびGI/5 (調べた限り2株であるが)のみに反応し、genogroup (GI)に特異的と考えられた (表1)。

### 3) すべてのSV-VLPsに反応するMAbs

表1に示すように、GI/5に対するMAb 8127およびGIV/1に対するMAb 800は、GII/3に対しては反応性が弱いものの、すべてのgenogroupに交叉するMAbsであることが分かった。この2つのMAbs (培養上清)は、ウエスタンブロット法においても交叉性を示した (図1)。

## D. 考察

今回得られたほとんどのMAbsが免疫源とのみ反応し、株特異的であった。これらのMAbsは、交叉性がないため、他のMAbsとカクテルする以外に検出・診断としての利用は難しいと考えられる。しかし、SVの抗原的解析などには役立つことが期待される。GIに特異的と考えられるMAbsもいくつか存在した。ただし、GI/1およびGI/5の2株で調べたのみであり、GIに特異的かどうかは、さらにGIの株を増やして検討する必要がある。また、調べた限りすべてのgenogroupに交叉するMAbsが2つ得られた。これらのMAbsは、ウエスタンブロット法においても交叉性が確認された。

今回は、いずれもクローンの培養上清による結果であるが、主なクローンについては腹水を作製し、現在検討中である。予備実験であるが、GI特異的と考えられるMAb 616については、腹水でも同様にGI/1およびGI/5のみに反応し、他のgenogroupとは反応しな