

図 4A 食品処理袋 (左:焼ハ[®]、右:ホテサラダ[®]) 図 4B 左:処理袋なし、右:処理袋使用

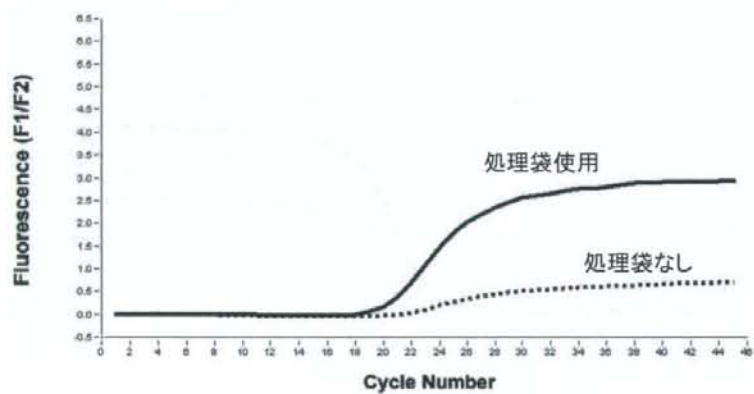


図 4C 食品処理袋の効果 (ポテトサラダ)

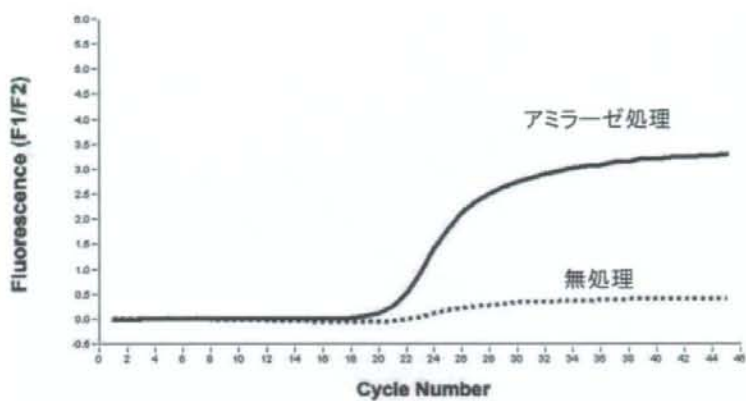


図 5A アミラーゼ処理の効果 (ポテトサラダ：処理袋なし)

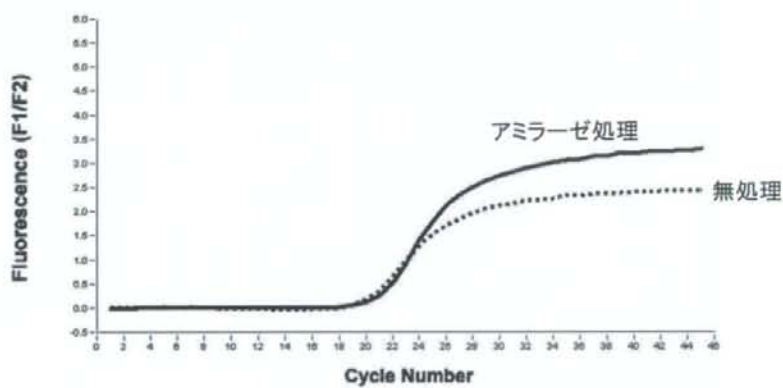


図 5B アミラーゼ処理の効果 (ポテトサラダ：処理袋使用)

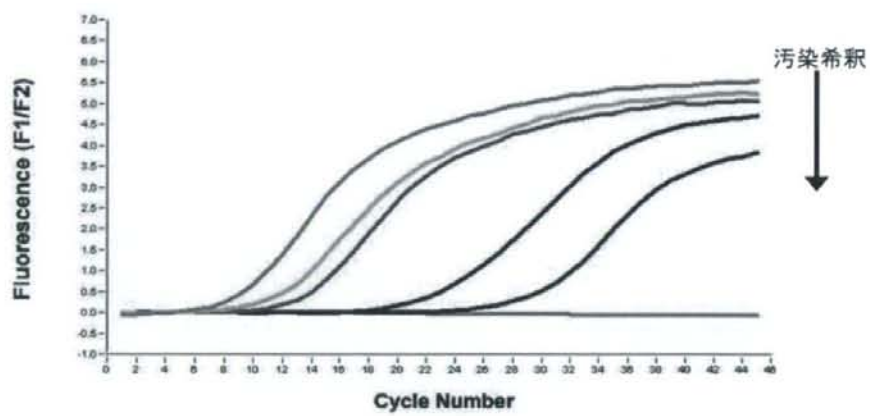


図 6 Nested PCR の例 (焼ソバ)

平成 20 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）
「食品中のウイルスの制御に関する研究」班
分担研究報告書

めん羊由来畜産物の E 型肝炎ウイルス汚染リスクの検討ならびに
豚での本ウイルス感染実態調査

分担研究者：恒光 裕（動物衛生研究所 ウイルス病研究チーム）

研究要旨：めん羊における E 型肝炎ウイルス（HEV）感染の実態を明らかにする目的で、野外血清を用いた HEV 抗体検査ならびにめん羊肉とレバーを用いた HEV 遺伝子検査を実施した。まず、計 37 店舗で購入しためん羊肉 54 パッケージならびにめん羊レバー44 パッケージから RNA を抽出し、nested RT-PCR 法により HEV RNA 検査を行った。その結果、いずれの材料からも HEV RNA は検出されなかった。次に、14 農場より採材しためん羊血清計 204 例について、HEV ウイルス様粒子を用いた ELISA 法により HEV 抗体検査を実施した。その結果、一部のめん羊血清は高い OD 値を示したが、OD 値の分布は一峰性分布を示した。OD 値が 1 以上を示した血清は吸収操作により OD 値の減少がほとんど確認されなかった（減少率-8%~8%）。よって、ELISA 法で高値を示しためん羊血清が HEV 抗体陽性とは判断できなかった。以上の結果より、めん羊が HEV の保有宿主である証拠は認められなかった。次に、野外豚における HEV の感染動態を明らかにする目的で、3 養豚場において肉豚発育ステージ別の豚血清ならびに糞便を採取して HEV RNA 検査を行った。その結果、糞便中の HEV RNA 量が出荷日齢で比較的高値を示す豚も確認された。

共同研究者

宮崎綾子（動物衛生研究所）

鈴木孝子（動物衛生研究所）

山田 学（動物衛生研究所）

服部奈千子（動物衛生研究所）

産物の HEV 汚染リスクを検討した。併せて、野外豚における HEV の感染動態を明らかにする目的で、糞便中 HEV RNA 量を測定した。

B. 研究方法

A. 研究目的

E 型肝炎は E 型肝炎ウイルス（HEV）の感染に起因するヒトの急性肝炎である。近年、豚などの動物も HEV の保有宿主であることが明らかにされ、また、加熱不十分な豚や野生動物の内臓肉などの喫食による本病の発生例が報告されたことから、動物や食品サイドからの HEV の調査研究が望まれている。本年度の研究では、野外めん羊血清を用いた HEV 抗体検査ならびにめん羊肉などを用いた HEV 遺伝子検査を実施し、めん羊由来畜

北海道・東北地方の 3 県 7 市町計 37 店舗（インターネット販売含む）からめん羊肉 54 パッケージならびにめん羊レバー44 パッケージを購入した。めん羊肉産地の内訳は、ニュージーランド産 13、オーストラリア産 39 および日本産 2 であった。めん羊レバー産地の内訳は、オーストラリア産 43、日本産 1 であった。PBS を用いて 20% 乳剤を作成し、RNA を市販の RNA 抽出キット（TRIZOL-LS；Invitrogen）で抽出した。抽出した RNA を用いて Huang らが報告した RT-PCR

法(J Clin Microbiol, 2002, 40: 1326-1332)により HEV 遺伝子の有無を検査した。次に、2004-2005 年に 5 県 14 農場より採材しためん羊血清計 204 例について HEV 抗体検査を実施した。HEV 抗体の測定は、Li らの報告したウイルス様粒子 (VLP) を抗原とした ELISA 法で実施し、血清材料を 200 倍希釈して使用した。なお、HRPO 標識抗めん羊 IgG 抗体は KPL 社の製品を用いた。OD が高値を示した血清の一部については、予め VLP (100 ug/ml; 陽性抗原) あるいは同じ濃度の昆虫細胞由来蛋白 (陰性抗原) と 37C で 1 時間反応させた後、ELISA 法を実施した (吸収試験)。

3 養豚場において肉豚発育ステージ別 (15 日、30 日、60 日、90 日、120 日、150 日および 180 日齢) の豚血清ならびに糞便を各 5 頭ずつ採取し、RNA を抽出

して nested RT-PCR 法 (定性) ならびにリアルタイム PCR 法 (定量) により HEV RNA 検査を行った。

C. 研究結果

いずれのめん羊由来材料からも HEV RNA は検出されなかった。

抗体検出 ELISA 法において、一部のめん羊血清は高い OD 値を示した (図 1)。しかし、OD 値の分布は二峰性分布ではなく一峰性分布を示した (図 1)。OD 値が 1 以上を示した血清は吸収操作により OD 値の減少がほとんど確認されなかった (減少率-8%~8%) (図 2)。このことから、ELISA 法で高値を示しためん羊血清が HEV 抗体陽性とは判断できなかった。これらの結果から、めん羊が HEV の保有宿主である証拠は認められなかった。

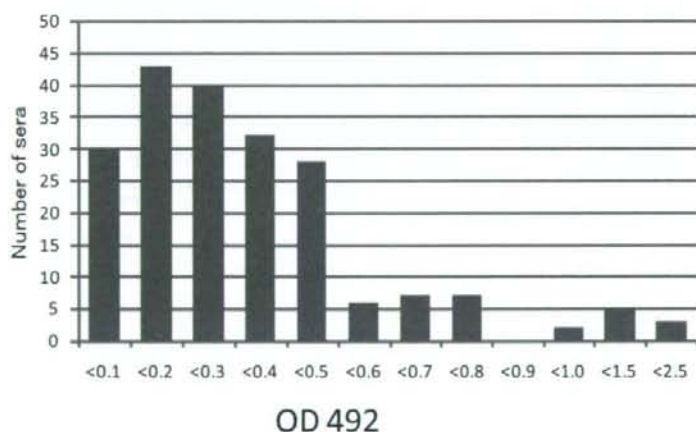


図 1. めん羊血清の HEV 抗体測定用 ELISA OD 値の分布

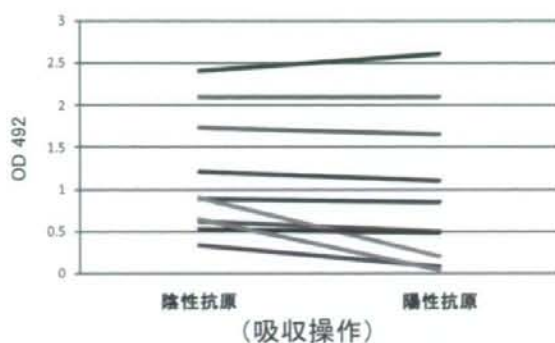


図2. 吸収操作によるELISA法の特異性確認

豚材料からの HEV RNA 検出を目的として、既報のリアルタイム PCR 法を比較した。その結果、Jothikumar らの方法 (J Virol Methods. 2006 131: 65-71) が有効であった。野外豚材料における本法と RT-PCR 法との結果はよく一致し、糞便中の HEV RNA は

HEV 抗体の上昇直前あるいは上昇後から検出されたが、血清からは全く検出されなかった。糞便中の HEV RNA 量は、出荷日齢で比較的高値を示す豚も確認された (図 3)。

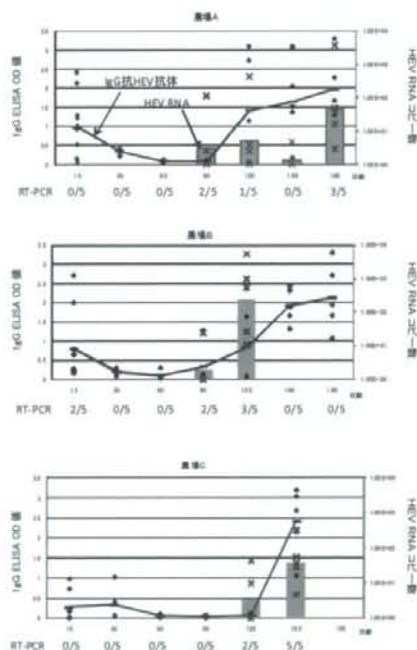


図3. 発育ステージ別の血清中抗HEV抗体ならびに糞便中HEV RNA

D. 考察

これまでめん羊から HEV が検出されたとする報告は無いが、子羊を用いた実験感染では感染が成立してウイルス排泄があったと報告されている (Vopr Virusol. 1994 39:165-168)。今回、HEV の国内感染と考えられるヒト症例は北海道に多いこと、北海道や東北の一部地域ではめん羊肉の消費量が非常に多いことに注目し、両者の関連の有無を明らかにする目的でめん羊における HEV 感染の調査を行った。国内で消費されるめん羊肉の99%以上はオーストラリアやニュージーランドなどからの輸入品であり、国内生産量は極めて少ない。本研究において、北海道を中心とした小売り店舗からめん羊畜産物を購入したが、国内産はほとんど認められなかった。これら材料から RNA を抽出して RT-PCR 法により HEV の検出を行った結果、陽性検体は確認されなかった。一方、抗体検出 ELISA 法で高い OD 値を示す血清が認められたが、吸収試験により反応の特異性は確認されなかった。このことから ELISA 法で認められた反応は非特異反応と考えられた。以上の結果より、めん羊の HEV 感染は確認されず、めん羊由来畜産物の HEV 汚染リスクは無いあるいは低いと推測された。

リアルタイム PCR 法と通常の nested RT-PCR 法で野外豚材料から HEV の検出を行ったが、両者の検査結果はよく一致した。すなわち、血清においてはいずれの材料からも検出されなかったが、糞便からはほぼ同じ材料から検出された。このことから今回実施したリアルタイム PCR 法は豚由来 HEV の検出に有効と考えられた。

豚での HEV の主要な感染月齢は2-3ヶ月齢であるが、一部の農場では肥育末期の豚で HEV 感染が認められる。一部の肥育末期豚の糞便において、リアルタイム PCR 法で HEV RNA 量が比較的高値を示した。このことから食品の糞便汚染は HEV 感染のリスク要因の一つと考えられた。

E. 結論

今回の研究によって以下のことが確認された。

1. 国内で販売されているめん羊肉ならびにめん羊レバーから HEV は検出されな

った。

2. めん羊血清を用いた HEV 抗体検査で、抗体陽性例は確認されなかった。

3. 豚での HEV 検査においてリアルタイム PCR 法は有効な検査方法である。

4. 糞便中の HEV RNA 量は、出荷日齢で比較的高値を示す豚も確認された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

和文解説

なし

誌上発表

なし

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

平成 20 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)
「食品中のウイルスの制御に関する研究」
分担研究報告書

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(2)

研究分担者：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：表面汚染が推定される食品からの簡便なノロウイルス検出法の確立を目的として、食品からのウイルスの回収法および濃縮法について検討した。PBS(-)、SDS Tris-Glycine(SDS-TG)、0.1%SDS加PBS(-)、1%Tween20加Tris(pH9)の4種類の回収液について、ノロウイルスを表面汚染させた7種類の食品からの回収率を調べた結果、回収に適した溶液は食品により異なったが、SDS-TGが最も安定した回収率を示した。ラズベリーからの回収率は溶出時間を長くするにつれ経時的に減少した。SDS-TGを溶液とした場合のポリエチレングリコール(PEG)沈殿は12%のPEG濃度(1M NaCl)が適していた。PEG沈殿後の沈渣をSDS-TGで再浮遊することにより、定量値は増加した。以上の結果から、SDS-TGは表面汚染が推定される食品からのウイルスの回収及び濃縮に有用であると考えられた。

A. 研究目的

近年のノロウイルス(NV)食中毒は、調理従事者を介した食品汚染を原因とする事例が多数を占めている。調理従事者から食品が汚染される経路は、調理従事者の手指から食品が直接的に汚染される場合の他、手指から食器、シンク等の調理器具、施設内の調理設備等を介して食品が間接的に汚染される場合など、様々な汚染経路が推定されている。しかしながら汚染部位に関しては、その推定される汚染経路から、直接的、間接的な食品汚染に関わらず、食品の表面が汚染される場合が多いと考えられる。

昨年度の研究において、表面汚染が

推定される食品からの簡便なノロウイルス(NV)検出法の確立を目的として、NVを表面汚染させたマグロ赤身から18種類の試験液を用いて試験液へのウイルス回収量を調べた。その結果、回収ウイルス量は試験液により異なり、SDS Tris-Glycine(SDS-TG)、0.1%SDS加PBS(-)(0.1%SDS-PBS)、1%Tween20加Tris(pH9)(1%Tw20-Tris9)などが高い回収率を示した。そこで、今年度は、これらの試験液についてマグロ赤身以外の食品について回収率を調べ、それらの有用性を比較した。また、回収液からのウイルス濃縮法について、ポリエチレングリコール(PEG)沈殿法の改良等を試みた。

B. 研究方法

1. 各食品からの NV 回収率の比較

昨年度の研究でマグロ赤身からの添加回収実験で高い回収率を示した SDS-TG (第一化学)、0.1%SDS-PBS、1% Tw20-Tris9 および対照として PBS(-) の 4 種類の試験液を用いた。食品は、ご飯(炊いてパック詰めにしたもの)、食パン、ポテトサラダ(惣菜用)、中華春雨(惣菜用)、鶏の唐揚げ(惣菜用)、ブルーベリー(冷凍食品を解凍したもの)、ラズベリー(冷凍食品を解凍したもの)を用いた。各食品約 1~3g を 50ml 遠心管入れた後、 1.03×10^6 コピー数/25 μ l の NV(GII/4) を含む糞便遠心上清希釈液 25 μ l を添加し、室温で 2 時間放置した。放置後、4 種類の試験液 10ml を加え、軽く 10 回転倒混和した後、室温で一夜放置した。再度、軽く 10 回転倒混和した後、溶液を 12ml 遠心管に移し、10,000rpm、20min、室温で遠心分離を行った。遠心上清 70 μ l から QIAamp Virus RNA Mini Kit(Qiagen)を用いて RNA 抽出を行い、DNase 処理後、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit(ABI)および Oligo dT を用いて cDNA を合成した。Kageyama らのリアルタイム PCR 法(J Clin Microbiol, 41, 1548-1557, 2003)により cDNA 5 μ l 中の NV を定量し、得られた定量値から回収液全体の NV RNA コピー数を算出し、回収率を求めた。試験液ごとに 3 回実験を繰り返し、その平均値を回収率とした。

2. 濃縮法の検討

マグロ赤身 2~3g に SDS-TG 10ml あ

るいは PBS(-) を加え、上記と同様に攪拌一夜放置などを行い、遠心した上清をマグロ赤身由来物質を含む試験液(マグロ赤身含有液)とした。食品を含まない SDS-TG あるいは PBS(-) およびマグロ赤身含有液に上記の添加用ウイルス液を添加し、各種の濃縮法の検討に用いた。

PEG 沈殿は各種濃度の PEG に 1M NaCl を加えた条件で行った。遠心分離は、PBS(-) を溶液とする場合は 4 $^{\circ}$ C、SDS-TG を溶液とする場合は室温で、10,000rpm、30min で行い、沈渣を蒸留水 400 μ l に再浮遊した。RNA の定量は、PEG 沈殿後の上清で上清 70 μ l を抽出材料とした。沈渣は、再浮遊液をよく攪拌したもの(遠心なし)、12,000rpm、5min 遠心した上清(遠心上清)、および 2 倍濃度 SDS-TG で 2 倍希釈したものおよびその遠心上清について定量した。

研究結果

1. 各食品からの NV 回収率の比較

7 種類の食品からの NV 回収実験の結果を図 1 に示した。ご飯では SDS-TG、食パンでは 0.1%SDS-PBS、ポテトサラダでは 0.1%SDS-PBS、SDS-TG、中華春雨では PBS(-)、SDS-TG、鶏の唐揚げでは 0.1%SDS-PBS、PBS(-)、ブルーベリーでは 4 試験液とも 80%以上の回収率を示し、回収に適した試験液は食品の種類により異なった。

上記 6 種類の食品では概ね良好な回収率が得られたが、ラズベリーでは 4 試験液とも 25%以下の低い回収率を示した(図 1)。この原因を調べるため

に、ラズベリーに試験液を添加直後、2hr 放置後、一夜放置後の回収率を調べた結果、SDS-TG では直後で 94%、2hr 後で 28%、一夜放置後で 11%と、溶出時間を長くするにつれ回収率は低下した(表 1)。この経時的な回収率の減少は 1% Tw20-Tris9、0.1% SDS-PBS、PBS(-)でもみられた。

昨年実施したマグロ赤身ブロックの結果を含め、8 種類の食品からの各試験液の回収率を表 2 にまとめた。SDS-TG が最も安定した回収率を示し、平均回収率も 94%で最も高い値であった。

2. PEG 沈殿の改良

SDS-TG を溶液とした場合の PEG 沈殿条件を決定するために、NaCl 濃度を 1M として各種濃度の PEG6000 での NV 回収率を調べた。食品非含有 PBS(-)では 8%あるいは 12%の PEG 濃度が比較的高い回収率であったが、約 10%しか回収されず、60%以上は上清に残った(表 3)。食品非含有 SDS-TG では 16%~20%を中心に 12%から 32%の PEG 濃度まで、16%~24%の回収率であったが、8%PEG では 3%と低い回収率であった。上清のウイルス量をみても 8%PEG ではほとんどが残存し、12%以上の PEG 濃度でも約 10%以上は上清に残存した。以上から、食品非存在下では、SDS-TG による PEG 沈殿は、PBS(-)より濃縮率が高いものの、完全には沈殿しなかった。

次に、マグロ赤身含有の PBS(-)および SDS-TG で PEG 沈殿を行った(表 4)。沈殿については沈澱がみられたこと

から、蒸留水による再浮遊液の遠心上清について定量した結果、8%から 20%の PEG 濃度で PBS(-)を溶液とした場合は 5%以下、SDS-TG では 24%以下の回収率であった。一方、PEG 沈殿後の上清からはほとんどウイルス RNA は検出されず、大半は沈殿したと考えられたため、何らかの理由により見かけ上定量値が低く定量されている可能性が考えられた。そこで、再浮遊液を遠心せずに定量した結果、PBS(-)では約 28~45%、SDS-TG では約 16~24%の回収率となり、SDS-TG の回収率は大きくは変化しなかったが、PBS(-)では大きく増加した。この理由として、SDS-TG の場合は、沈殿に残存する SDS-TG が含まれ沈澱が可溶化しており、遠心の影響が少ないことが考えられた。そこで、再浮遊液を 2 倍濃度の SDS-TG で希釈して定量を試みた結果、遠心の有無に関わらず PBS(-)で約 33%、SDS-TG で約 41~49%の回収率となった。

3. その他の検討

食品を含まない PBS(-)およびマグロ赤身含有液に添加用ウイルス液を添加し、エタノール沈殿、イソプロパノール沈殿、硫酸沈殿(40%、50%、60%、80%)について回収率を調べたが、PEG 沈殿と比較して特に高い回収率は得られなかった(データ示さず)。また、PEG 沈殿後の再浮遊液からの RNA 抽出法について、フェノール抽出、酸性フェノール抽出、他の RNA 抽出キットを用いた方法を試みたが、いずれも良好な結果は得られなかった(データ

示さず)。

D. 考察

昨年の本研究で、NV を表面汚染させたマグロ赤身からの回収実験で高い回収率を示した SDS-TG、0.1%SDS-PBS、1% Tw20-Tris9 および対照とした PBS(-) を用いて7種類の食品からの添加回収実験を実施した。その結果、回収率は食品の種類により異なり、また、回収率の高い試験液は食品の種類により異なったが、SDS-TG が最も安定した回収率を示した。マグロ赤身を含めた SDS-TG の平均回収率は約 94% であり、表面汚染が推定される食品からの回収(溶出)液として有用と考えられた。0.1%SDS-PBS(-) も高い回収率であったが、中華春雨では約 33% と、低い回収率となる場合も認められた。

ラズベリーでは、食品に回収液を添加直後の回収率が最も高く、以後経時的に回収率が低下した。4種類の試験液のいずれにおいても同様の傾向が観察されたが、特に、PBS(-) 以外の3試験液で顕著であった。この理由として、ラズベリーに含まれる色素が試験液に溶出していたことから、RNA 抽出後の過程、特に、逆転写反応、PCR 反応を阻害する物質が溶出し、定量値を見かけ上低下させた可能性が考えられた。経時的な回収率の減少は、今回試験に供した食品を含め、他の食品でも生じる可能性がある。従って、SDS-TG を回収液とする場合でも、食品の種類ごとの回収率を検討し、極端に低い回収率の場合は、溶出時間の影響

を調べる必要がある。

現在、溶液中のウイルスを濃縮する方法として最も一般的に実施されている方法は、超遠心分離と PEG 沈殿である。今回、高価な機器を必要とせず汎用性の高い PEG 沈殿法について、SDS-TG を溶液とした場合の PEG 濃度の最適化を試みた。食品非添加の条件で、PBS(-) が約 10% の回収率であったのに対し、SDS-TG は約 20% と約 2 倍の回収率を示した。PEG 濃度は 8% では低い回収率であったが、12% 以上では、20% が最も高い回収率を示したものの、概ね一定した回収率であった。一方、マグロ赤身含有 SDS-TG では 12% PEG が最も高い回収率であった。これらのことから、SDS-TG で PEG 沈殿を行う場合、12% PEG (1M NaCl) が適していると考えられた。

今回のマグロ赤身含有液での実験で、蒸留水の代わりに SDS-TG で再浮遊することにより回収率が大幅に増加し、かつ遠心の有無にあまり影響を受けないことが示された。厚生労働省のマニュアルには PEG 沈殿後の沈渣は「蒸留水に再浮遊し、浮遊液に不純物が多い場合は、その遠心上清を RNA 抽出に用いる」と記載されている。今回の結果では、蒸留水に再浮遊した場合、遠心上清よりも遠心をしない浮遊液を用いた場合の回収率が高かった。一方、遠心しない場合、沈渣が RNA 抽出用フィルタに詰まるなどの理由により、逆に回収率が低下することもあるため、遠心処理の優劣は一概に結論付けることはできない。しかし、SDS-TG

では、遠心処理の影響を受けにくいことから、その点においても蒸留水を用いる場合より有利と考えられる。現在、SDS-TG を含め PEG 沈殿後の再浮遊の条件を検討中である。また、今回マグロ赤身含有液について SDS-TG による PEG 沈殿は PBS(-) を用いる場合より回収率が高いことが示されたが、今後、他の食品についても検討を重ねる必要がある。

マグロ赤身含有液では PEG 沈殿後の上清からは、ほとんどウイルスは検出されなかったが、食品非存在下ではかなりの量のウイルスが残存し、完全には沈殿しなかった。食品由来物質の含有量を減ずることにより回収率が低下する(未発表データ)ことも観察されていることから、PEG 沈殿で効率よくウイルスを回収するためには、ある程度の共沈物質が必要であると考えられた。

PBS(-)、SDS-TG のいずれの溶液においても、PEG 沈殿後の上清の定量値は PEG 濃度の増加とともに低下し、また沈渣の定量値も PBS(-) では 12% 以上、SDS-TG では 24% 以上で低下傾向にあったことから、PEG 自体が定量値に影響しているものと考えられる(表 3)。しかし、PEG 沈殿し、上清を廃棄した後、上清を十分に除去した場合と上清の除去が十分ではない場合を比較したところ、定量値に大きな違いは観察されなかった(データ示さず)ことから、実際の検査に当って残存する PEG の影響は大きくはないものと考えられた。

E. 結論

表面汚染が推定される食品からの簡便なノロウイルス検出法の確立を目的として、食品からのウイルスの回収法および濃縮法について検討した。回収に適した溶液は食品の種類により異なったが、SDS-TG が最も安定した回収率を示した。ラズベリーは溶出時間を長くすると定量値が低下した。食品非存在下(共沈物質なし)の場合、PEG 沈殿の回収率は、PBS(-) で約 10%、SDS-TG で約 20% であった。マグロ赤身含有下で、SDS-TG で PEG 沈殿し、同液に再浮遊した場合、回収率は約 60%(12%PEG6000、1M) であった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① Hansman GS, Oka T, Li TC, Nishio O, Noda M, Takeda N: Detection of Human Enteric Viruses in Japanese Clams, J Food Protect, 71, 1689-1695 (2008)
 - ② 有田知子、木村博一、野田 衛、西尾 治: パンに含まれるノロウイルスの回収法の検討, 感染症学雑誌, 82, 473-475 (2008)
 - ③ 野田 衛: ウイルス性食中毒の検査, 臨床と微生物, 585-591 (2008)
- ### 2. 学会発表
- ① 飯塚節子, 岡 智一郎, 片山和彦, 武田直和, 野田 衛: サポウイルス

スとノロウイルスが検出された食中毒事例，第 56 回日本ウイルス学会学術総会，岡山市，10/28 (2008)

- ② 植木 洋，庄司美加，山本美和子，阿部勝彦，伊藤文明，池田義文，西尾 治，岡 智一郎，片山和彦，武田直和，野田 衛：カキを用いたサポウイルスの環境調査，第 56 回日本ウイルス学会学術総会，岡山市，10/28 (2008)
- ③ 田村 務，西川 眞，野田 衛，武田直和，田中智之，鈴木 宏：急性胃腸炎患者から嘔吐後に採取された口腔うがい液中のノロウイルスの定量，第 56 回日本ウイルス学会学術総会，岡山市，10/28 (2008)
- ④ 野田 衛，阿部勝彦，伊藤文明，武田直和：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，第 29 回日本食品微生物学会学術総会，広島市，11/12 (2008)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

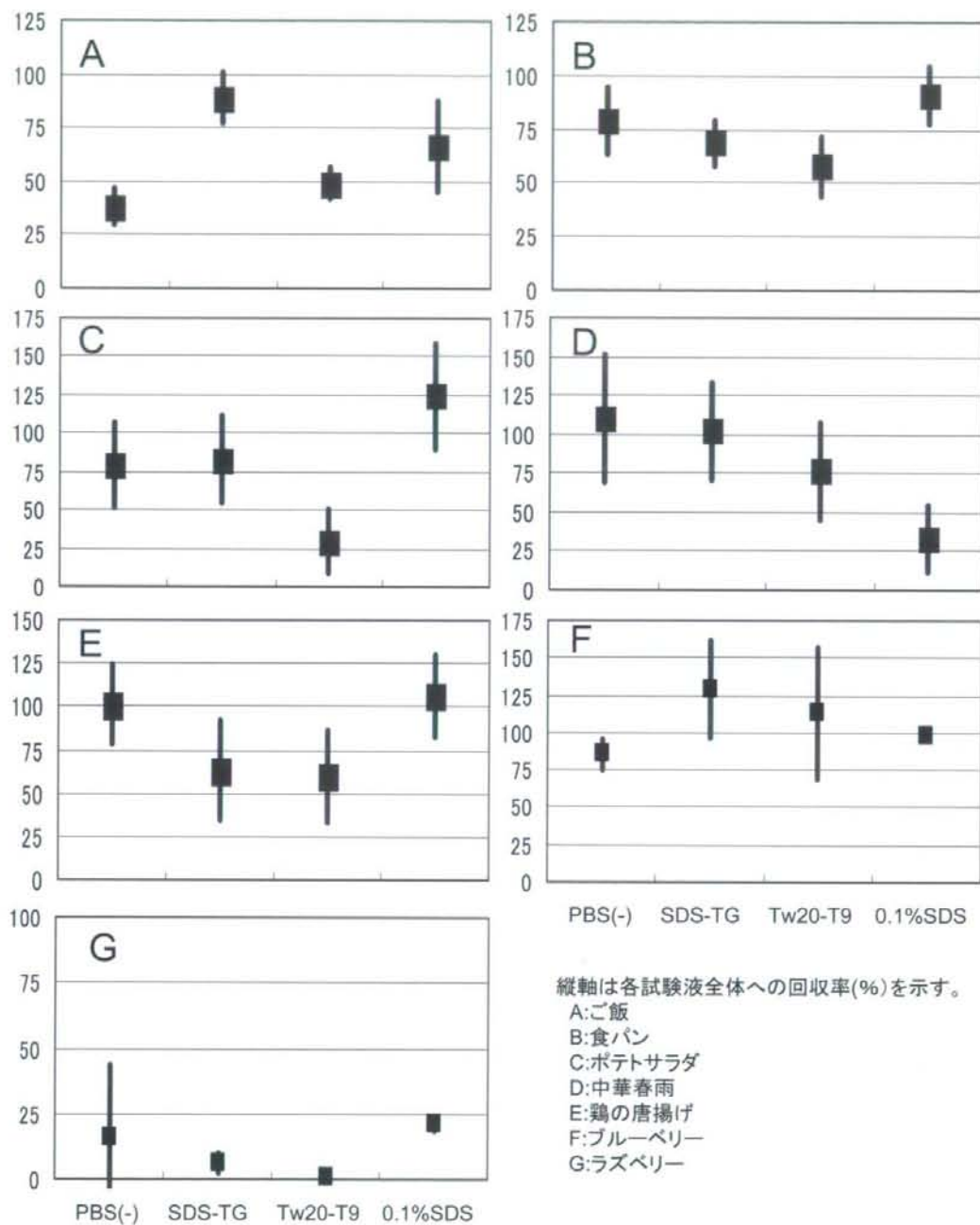


図1 各種食品からの各試験液への回収率

表 1 ラズベリーからの NV 回収率の経時的変化

回収液	回収率±SD(%)	
	直後	一夜
PBS(-)	22.2 ± 24.9	12.1 ± 11.6
SDS-TG	93.6 ± 46.2	28.1 ± 6.3
0.1%SDS-PBS	31.4 ± 12.8	19.3 ± 18.8
1%Tw20-Tris9	77.0 ± 17.3	62.5 ± 66.6
平均	56.0 ± 34.6	30.5 ± 22.3
		17.5 ± 13.2

表 2 各種食品からの NV 回収率

食品	回収率±SD(%)				平均
	PBS(-)	SDS-TG	0.1%SDS-PBS	1%Tw20-Tris9	
マグロ赤身	60.7 ± 6.8	119.7 ± 19.2	101.0 ± 27.1	94.3 ± 25.7	93.9 ± 24.6
ごはん	37.9 ± 8.4	88.6 ± 11.6	66.3 ± 21.3	49.1 ± 7.4	60.5 ± 22.1
食パン	78.4 ± 15.3	68.6 ± 10.3	91.3 ± 13.2	58.0 ± 13.6	74.1 ± 14.2
ポテトサラダ	79.3 ± 27.1	82.7 ± 28.2	124.5 ± 34.2	29.4 ± 20.3	79.0 ± 38.9
中華春雨	110.7 ± 40.5	102.3 ± 30.7	33.4 ± 21.3	76.7 ± 30.9	80.8 ± 34.7
鶏の唐揚	101.2 ± 23.2	63.3 ± 27.8	106.6 ± 23.6	59.8 ± 26.4	82.7 ± 24.6
ブルーベリー	85.2 ± 10.7	129.2 ± 32.4	98.5 ± 3.5	112.8 ± 43.1	106.5 ± 18.9
ラズベリー*	22.2 ± 24.9	93.6 ± 46.2	77.0 ± 17.3	31.4 ± 12.8	56.0 ± 34.6
平均	72.0 ± 30.2	93.5 ± 23.0	87.3 ± 28.1	63.9 ± 29.3	79.2 ± 16.4

*: 試験液添加直後(1分程度)の回収率

表3 食品非存在下でのPEG沈殿回収率

PEG沈殿条件	上清中の量(%)	回収率±SD(%)	[検査数]
8%PEG 1M MNaCl in PBS	79.8	9.5 ± 3.7	[5]
12%PEG 1M NaCl in PBS	60.3	10.3 ± 4.5	[5]
16%PEG 1M NaCl in PBS	54.4	7.1 ± 3.7	[5]
20%PEG 1M NaCl in PBS	44.6	4.8 ± 1.5	[5]
8%PEG 1M NaCl in SDS-TG	109.2	3.3 ± 1.4	[5]
12%PEG 1M NaCl in SDS-TG	35.2	19.2 ± 7.9	[8]
16%PEG 1M NaCl in SDS-TG	25.7	21.2 ± 7.6	[8]
20%PEG 1M NaCl in SDS-TG	11.5	23.5 ± 8.3	[8]
24%PEG 1M NaCl in SDS-TG	ND*	18.2 ± 1.9	[5]
28%PEG 1M NaCl in SDS-TG	ND	18.3 ± 1.8	[5]
32%PEG 1M NaCl in SDS-TG	ND	16.2 ± 1.9	[5]

*: 検査せず

表4 マグロ赤身由来物質存在下でのPEG沈殿回収率

PEG沈殿条件	上清中の量(%)	DWで再浮遊後の回収率±SD(%) [A]				[A]を2XSDS-TGで2倍希釈後の回収率(%)		
		遠心上清(N=3)		遠心なし(N=3)		遠心上清	遠心なし	遠心なし
		遠心上清(N=3)	遠心なし(N=3)	遠心上清(N=3)	遠心なし(N=3)			
8%PEG 1M MNaCl in PBS	0.4	1.5 ± 1.5	40.0 ± 11.6	46.8	36.7			
12%PEG 1M NaCl in PBS	0.0	3.0 ± 1.9	45.0 ± 12.3	32.6	33.5	38.7	32.7	
16%PEG 1M NaCl in PBS	0.1	3.5 ± 1.8	38.9 ± 9.2	30.6	37.3			
20%PEG 1M NaCl in PBS	0.0	4.7 ± 5.1	27.5 ± 5.6	24.0	18.0			
8%PEG 1M NaCl in SDS-TG	0.5	23.0 ± 4.1	17.6 ± 8.4	46.5	34.5			
12%PEG 1M NaCl in SDS-TG	0.0	24.1 ± 7.3	22.3 ± 10.2	53.3	41.2	71.8	48.6	
16%PEG 1M NaCl in SDS-TG	0.0	12.1 ± 3.0	15.9 ± 3.2	35.5	49.4			
20%PEG 1M NaCl in SDS-TG	0.0	0.5 ± 0.6	23.6 ± 8.0	29.4	38.6			

分担研究課題：2006-2008年の間に流行したノロウイルスのウイルスゲノム解析

研究分担者：本村和嗣（国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター 研究員）

研究要旨：2006-2007 秋冬期シーズンは、日本国内で過去最高のノロウイルス感染者数が発生した。我々は、周期的大流行に関わるウイルスの性質を理解するために、2006 年よりノロウイルス流行株のゲノム全長解析を継続的に実施している。2006-2008 年に日本に流行したノロウイルス GII/4 株の遺伝子型と構造の特徴を報告する。計 117 株のゲノム情報を取得した。対象の 92% (108/117) が、GII/4 EU-2006b に感染していた。他に GII/4EU-2006a と 2004/2005 年の日本 GII/4 流行株が検出された。2006b は、2005/2006 秋冬期には、ほとんど検出されず、2006 年に急増し、2007-2008 秋冬期も優勢であった。2006a と 2004/2005 流行株は、2005/2006 秋冬期には 2006b より高頻度に検出されたが、2006 年は局地的流行に留まり、2007-2008 秋冬期にはほとんど検出されなかった。2006b の 3 種の ORF には、過去の流行株には認められない 27 のアミノ酸置換が生じ、そのうち 7 箇所はキャプシド最外郭 P2 領域に集中していた。以上より、キャプシド P2 領域に多数の新規アミノ酸置換をもつ GII/4 変異株が生じることが大流行の一因となる可能性が推察された。

A. 研究目的

ノロウイルスは、直径 30-38nm の小型球形ウイルスで、急性胃腸炎の原因となる。ノロウイルス感染症は、わが国においては、秋から冬季にかけて全国的に流行する。しばしば医療施設、高齢者施設、飲食施設、ホテルなどで集団発生し、甚大な社会被害をもたらす。このため、近年、厚生労働省、国立感染症研究所、都道府県衛生研究所等が協力して、流行の実態把握に努めている。ノロウイルス感染の流行規模は、数年おきに増強する。直近では、2006/7 秋冬期に世界的に大流行した。我が国でも感染症例報告数が前年度の 4-5 倍に達し、10 月-2 月の間の集団発生事例報告数も過去最悪 (1091 事例) となった。我々は、我が国に流行するノロウイルスゲノム全長の配列情報を継続的に蓄積し、データベース化する作業を 2007 年 1 月より開始した。収集したゲノム情報の解析をもとに流行発生のしくみを検討し、ノロウイルス感染症の予防と監視に役立てることをめざしている。2006 秋冬

期から 2007 秋冬期に全国各地で流行したノロウイルス GII/4 株のゲノム解析と予備的成果を報告する。

B. 研究方法

2006 年 05 月 15 日から 2008 年 02 月 03 日の間に、19 の道府県で発生し、各道府県の衛生研究所にてノロウイルス感染症と確定した 147 症例を対象とした。糞便中のノロウイルスゲノム RNA を抽出した。糞便に PBS を加え 10% 懸濁液を作成し、11000×g、20 分間遠心の後、その上清より、QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を使って、RNA を抽出した。G2SKF と Oligo dT₃₀SXN (Katayama K et. al; Virology. 2002 Aug 1;299(2):225-239.) を用いて cDNA を合成した。cDNA を template にして、4 種の GII/4 特異的プライマーを用いて相互に重複する NoV ゲノム cDNA 断片 2 種 (約 5.3kb, 2.5kb) を PCR 増幅した。ABI3730 (Applied Biosystems) を使い、direct sequencing 法により、塩基配列を調べた。117 の糞便試料について、

GII/4 ゲノム全長 (約 7.5 kb) の塩基配列を得た。

(倫理面からの配慮について)

なし

C. 研究結果

我々は、現在、2006年から2008年までの2年間に日本で流行したノロウイルス流行株のゲノム全長の解析を行っている。これまでに国立感染症研究所ウイルス二部と全国各地の衛生研究所 (図1) の協力を得て、計117株の全ゲノム情報 (約 9×10^5 塩基) を取得した。興味深いことに、対象の92% (108/117) が、同時期に欧米、香港で流行した新型 GII/4 変異株 "GII/4 EU-2006b 株" に感染していた。2006-2007年の株の解析については詳細な解析が完了し、英文専門誌に報告した (Motomura K, et al; *J. Virol.* 2008 Nov;82(22):11247-62)。この GII/4 EU-2006b 株は、2006年1-2月には、限局的ではあるが日本国内に存在したこともわかった (図2)。ただし、この時期には、国内では他の GII/4 変異株 (GII/4 EU-2006a と 2004/2005年の日本 GII/4 流行株) が GII/4 EU-2006b 株より優勢であった (図2-3)。GII/4 EU-2006b は、2007/8秋冬期も引き続き優勢な変異株として国内に流行していた。2006bの3種のORFには、過去の流行株には認められない27のアミノ酸置換が生じ、そのうち7箇所はキャプシド最外郭 P2 領域に集中していた。一方、2006a では、P2 領域の特異的アミノ酸置換は2箇所のみであった。2006b は、2006-2008年の間に变化しており、アミノ酸置換は、特に3A/Vpg、キャプシド P2 領域、VP2 領域に集中していた。

D. 考察

これまでの研究により、単一起源の新型 GII/4 変異株 (GII/4 EU-2006b 株) が、2006年の間に、世界各地に急速に広がったことが明

らかになった。また、我が国でも、2006年の間に、GII/4 EU-2006b 株が既に存在する他の GII/4 変異株を凌駕して、急速に広がった実態が判明した (図3)。航空輸送網や経済網の発達などにより、ノロウイルスに汚染された物資やヒトが国内はもとより、大陸を超えて運搬されていると推察される。社会環境の変化が新興再興感染症を生み出す一つの例と言える。また、GII/4 EU-2006b 株は、1年のうちに、それぞれの地域に存在する多様なノロウイルス変異集団と置き換わった。この株は、ヒトで効率的に広がるための性質を獲得した変異株と推測される。この株に特徴的なキャプシド蛋白質 VP1 領域の変異は、ウイルス増殖能を変化させるかもしれない。今のところは、ウイルス増殖系が無いために、ゲノム変異の意味について決定的な結論は出せない。しかし、日々蓄積するノロウイルスのウイルス学情報と計算機を用いた蛋白質の構造・機能変化の解析をもとに、変異がウイルスの変化に及ぼす影響をある程度正確に推測することは可能と考えている。

E. 結論

GII/4変異株の周期的流行のしくみは、まだ完全にはわかっていない。しかし、一つの有力な仮説が提唱されている (Siebenga JJ et al; *J. Virol.* 2007 Sep ;81(18):9932-41, Lindesmith LC et al; *PLoS Med.* 2008 5:e31.)。すなわち、「ヒト社会では、日常的なノロウイルスへの暴露により、一定の抗ノロウイルス免疫バリアーが形成されている。キャプシド最外郭領域 (P2サブドメイン) には中和エピトープが存在し、この領域に多数の変異が蓄積した GII/4変異株は、ヒト集団の免疫バリアーを回避する能力に優れているため、ヒトの間に広がりやすい」との仮説が想定されている。この仮説は、ノロウイルスの高い感染力と物理化学的安定性、生活・自然環境における普遍的な分布などのよく知られている知見 (Huston AM et al; *Trends Microbiol.* 2004 Jun;12(6):279-87.,

Estes MK et. al; *Curr Opin Infect Dis* 2006, 19:467-474.) と、我々やオランダ、アメリカの研究グループの研究結果 (Siebenga JJ et. al; *J. Virol.* 2007 Sep ;81(18):9932-41, Lindesmith LC et. al; *PLoS Med.* 2008 5:e31.) に基づき提唱された。この仮説は、キャプシドの高度変異株の出現と大流行が相関すること、新型変異株の流行は数年内に終息すること、などの観察結果を良く説明する。我々は、今後もこの仮説の是非について検証を重ねていく予定でいる。VP1 P2領域が再び変化した新型ウイルスが、次の流行を引き起こすのかどうか、を検討する必要がある。そこで、引き続きノロウイルスのゲノム情報の変化を追跡していきたい。ゲノム解析情報と、日々進展するノロウイルスの生物学情報を解析することにより、ノロウイルス感染症の流行発生のメカニズムについて理解を深めたい。そして、得られた知見をノロウイルス感染症の対策に役立てていきたい。

謝辞

糞便試料の収集に、以下の先生にご協力いただきました。厚く御礼申し上げます。

田中智之先生 (堺市衛生研究所)、野田衛先生 (国立医薬品食品衛生研究所)、吉澄志磨先生 (北海道立衛生研究所)、三上稔之先生 (青森県環境保健センター)、斉藤博之先生 (秋田県健康環境センター)、高橋朱実先生 (岩手県環境保健研究センター)、植木洋先生 (宮城県保健環境センター)、田村務先生 (新潟県保健環境科学研究所)、滝澤剛則先生 (富山県衛生研究所)、篠崎邦子先生 (千葉県衛生研究所)、吉田徹也先生 (長野県環境保全研究所)、小林慎一先生 (愛知県衛生研究所)、東方美保先生 (福井県衛生環境研究センター)、内野清子先生 (堺市衛生研究所)、入谷展弘先生 (大阪市立環境科学研究所)、福田伸治先生 (広島県立総合技術研究所保健環境センター)、飯塚節子先生 (島根県保健環境科学研究所)、近藤玲子先生 (愛媛県立衛生環境研究所)、船津丸貞幸

先生 (佐賀県衛生薬業センター)、松岡由美子先生 (熊本市環境総合研究所)、岩切章先生 (宮城県衛生環境研究所)

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1.論文発表

- 1) Motomura, K., Oka T, Yokoyama M, Nakamura H, Mori H, Ode H, Hansman GS, Katayama K, Kanda T, Tanaka T, Takeda N, Sato H; and the Norovirus Surveillance Group of Japan. Identification of monomorphic and divergent haplotypes in the 2006-2007 norovirus GII/4 epidemic population by genomewide tracing of evolutionary history. *Journal of Virology.* 2008 Nov;82(22):11247-62
- 2) 本村和嗣, 終元巖, 佐藤裕徳 “PCR 法(ウイルス)” ;KEY WORD 感染症 第二版;2008年6月発行;先端医学社
- 3) 本村和嗣, 佐藤裕徳 “ノロウイルス感染症”;総合臨床 2008年11月号 p2697-p2702;永井書店
- 4) 佐藤裕徳, 大出裕高, 本村和嗣, 横山勝 “HIVの構造と感染・増殖の分子機構”;日本臨床 2009年1月号 p37-p42;日本臨床社
- 5) 2008年9月16日;日本経済新聞 夕刊「ノロウイルス感染症」

2.学会発表

- 1) 本村和嗣, 岡智一郎, 中村浩美, 守宏美, Hansman Grant, 横山勝, 片山和彦, 神田忠仁, 武田直和, 佐藤裕徳 “2006-2007年の間に流行したノロウイルスのウイルスゲノム解析”, 第81回日本感染症学会総会、島根(2008.4)
- 2) 本村和嗣, 横山勝, 岡智一郎, 中村浩美, 守宏美, 片山和彦, 神田忠仁, 田中智之, 武田直和, 佐藤裕徳 “2006-2007年の間に流行したノロウイルスのウイルスゲノム解析”, 第29回、

衛生微生物技術協議会、ウイルス情報交換会

“ウイルス性下痢症”、東京(2008. 6)

3) 本村和嗣, 横山勝, 岡智一郎, 中村浩美, 守宏美, Hansman Grant, 片山和彦, 田中智之, 真崎宏則, 星野和彦, 蔭本恭, 秋山美穂, 木村博一, 神田忠仁, 武田直和, 佐藤裕徳,

Norovirus Surveillance Group of Japan “ノロウイルスの免疫淘汰と周期的流行の分子機序”, 第56回 日本ウイルス学会総会、ワークショップ、岡山(2008. 10)

4) 岡智一郎, 横山勝, 片山和彦, 恒光裕, 山下真民, 宮下佳奈, 本村和嗣, 中村浩美, 守宏美, 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に影響する切断部位上流アミノ酸残基の解析”, 第56回 日本ウイルス学会総会、岡山(2008. 10)

5) 小澤一弘, 岡智一郎, 片山和彦, 本村和嗣, 中村浩美, 守宏美, 佐藤裕徳, 武田直和 “調理従事者を対象としたノロウイルスの網羅的検出調査”, 第

56回 日本ウイルス学会総会、岡山(2008. 10)

6) Ivo Sah Bandar, 高橋清実, 長縄 聡, 本村和嗣, 佐藤裕徳, 北村勝彦, 佐藤成大 ” Clinical profile and molecular epidemiology of HIV/AIDS Patients in Jakarta, Indonesia” 第22回日本エイズ学会総会、大阪(2008. 11)

7) 岡智一郎, 横山勝, 片山和彦, 恒光裕, 山下真民, 宮下佳奈, 本村和嗣, 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活性発現に重要なアミノ酸残基の解析”, 第31回日本分子生物学会総会、神戸(2008. 12)

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