

PCR 法による集団及び散発下痢症事例の起因
ウイルス調査

日本獣医学会学会年次大会（日本産業動物獣医学
学会、日本小動物獣医学会医及び日本公衆衛
生学会合同年次大会）、岩手、2009 年1月
22-24 日

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。

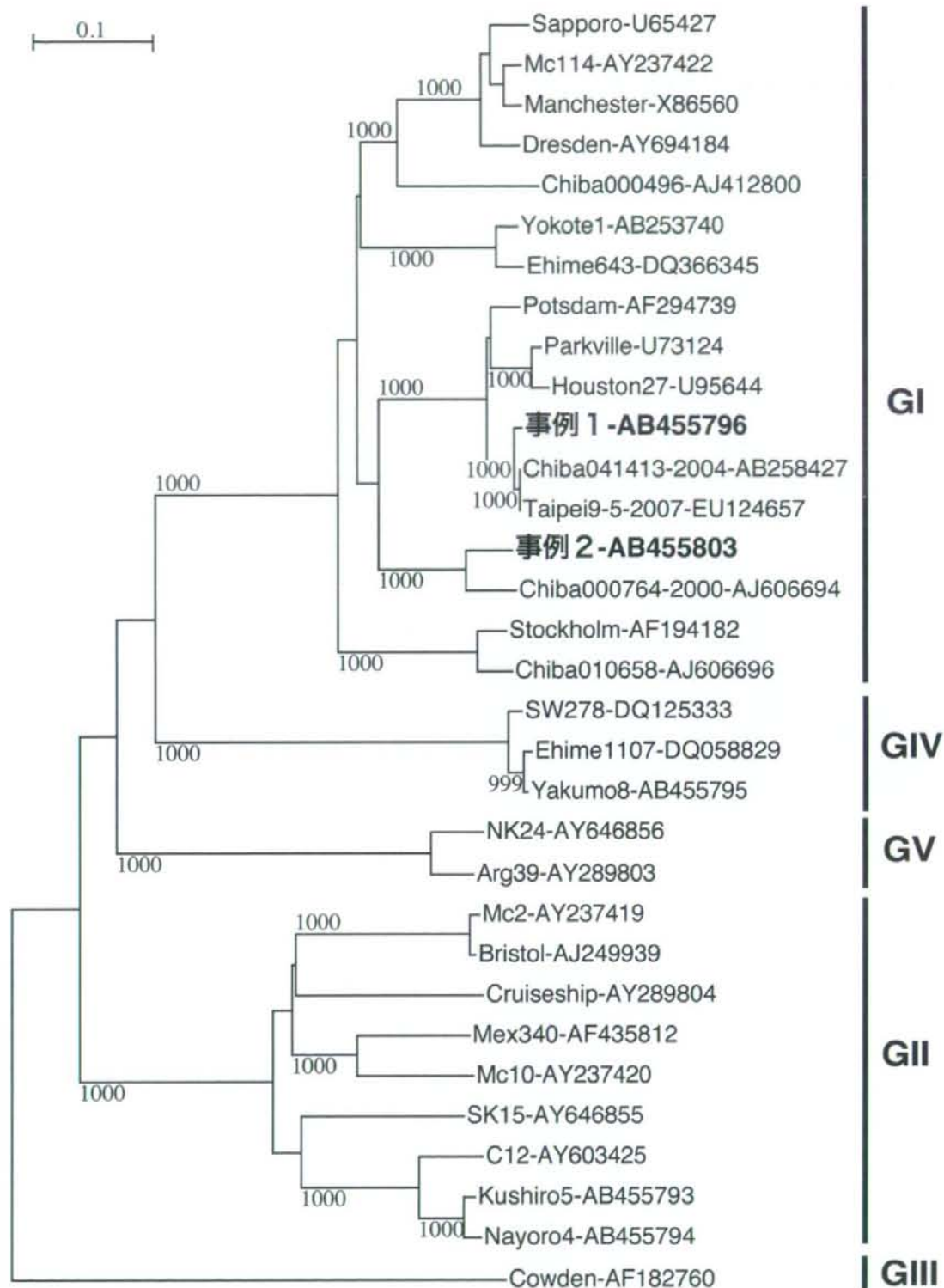


図 1. サポウウイルスの系統樹解析

表1. 病原因子の検出内訳

Year	検査対象数	陽性検体数	NoVGI	NoV GII	SaV	AdV	KV	RoV(A)	RoV(C)	AdV	EntV	Bacteria
2002	36	23 (63.9) ^a	7 (10.9)	19 (82.6)	2 (8.7)	2 (3.1)	2 (8.7)	2 (8.7)				
2003	115	64 (55.7)	4 (10.9)	28 (43.8)	7 (10.9)	2 (3.1)	20 (31.3)	1 (1.6)		1 (1.6)		
2004	53	40 (75.5)	6 (10.0)	23 (57.5)	2 (5.0)	2 (5.0)	3 (7.5)	4 (10.0)		4 (10.0)	5 (12.5)	
2005	107	60 (56.1)	1 (1.8)	44 (73.3)	7 (11.7)	1 (1.7)	5 (8.3)					
2006	75	57 (76.0)	2 (1.1)	33 (57.9)	10 (17.5)	4 (2.3)	8 (14.0)			4 (7.0)	2 (3.5)	2 (3.5)
2007	253	177 (70.0)	20 (4.8)	93 (52.5)	53 (29.9)	9 (2.1)	10 (5.6)			10 (5.6)	6 (3.4)	9 (5.1)
Total	639	421 (65.9)	20 (4.8)	240 (57.0)	81 (19.2)	9 (2.1)	48 (11.4)	1 (0.2)	1 (0.2)	19 (4.5)	13 (3.1)	11 (2.6)

a ()内は検出率。

混合感染の内訳

Year	陽性検体数	混合感染数	NoV GI		RoV(A)		SaV		AstV		KV		EntV		SaV		RoV(A)		AdV		
			NoV GI	NoV GI	NoV GI	NoV GI	NoV GI	NoV GI	NoV GI	NoV GI	NoV GI	NoV GI	NoV GI	NoV GI	NoV GI	NoV GI	NoV GI	NoV GI	NoV GI	NoV GI	NoV GI
2002	23	0																			
2003	64	2			1				1												
2004	40	3		2																	
2005	60	3		1	1			1													
2006	57	3			2						1										
2007	177	10			1			2				1									
Total	421	22 (5.2) ^a	3 (0.7)	3 (0.7)	5 (1.2)		3 (0.7)	2 (0.5)	3 (0.7)	1 (0.2)	1 (0.2)	1 (0.2)	1 (0.2)	1 (0.2)	1 (0.2)	1 (0.2)	1 (0.2)	1 (0.2)	1 (0.2)	1 (0.2)	1 (0.2)

^a ()内は検出率。

表3 サボウイルス検出結果

Year	Strain Name	Accession no.	Multiplex RT-PCR ^a	RT-PCR ^b	nested RT-PCR ^c	Genogrouping RT-PCR ^d	Genogroup ^e	real-time RT-PCR copies/ml ^f	Sex	Year	Month	Diarrhea ^g	Vomiting	Abdominal Pain	Fever ^h	Other pathogen	
2002	Kumamoto1/Dec2002/JPN	AB429079	+	+	+	+	G I	4.20×10 ⁵	F	1	4	+					
	Kumamoto2/Dec2002/JPN	AB429080	+	+	+	+	G I	7.84×10 ⁵	F	1	9	+					
	Kumamoto3/Feb2003/JPN	AB429081	+	+	+	+	G I	9.12×10 ⁵	M	0	10	+					
	Kumamoto4/Feb2003/JPN	AB429082	+	+	+	+	G II	7.68×10 ⁵	M	1	9	+					
2003	Kumamoto5/Feb2003/JPN	AB429083	-	+	+	+	G II	5.57×10 ⁶	F	0	5	+					
	Kumamoto6/Mar2003/JPN	AB429084	+	+	+	+	G II	5.98×10 ⁶	F	1	0	+					
	Kumamoto7/Apr2003/JPN	AB429085	+	+	+	+	G II	1.98×10 ⁷	M	1	5	+					
	Kumamoto8/Dec2003/JPN	AB429086	-	+	-	+	G II	1.01×10 ⁷	M	4	11	+					
	Kumamoto9/Dec2003/JPN	AB429087	-	+	+	+	G II	1.18×10 ⁹	F	2	0	+					
2004	Kumamoto10/Jan2004/JPN	AB429088	-	+	+	+	G V	1.78×10 ⁹	M	8	2	+					
	Kumamoto11/Dec2004/JPN	AB429089	-	+	+	+	G V	1.97×10 ⁹	F	4	6	+					
	Kumamoto12/Jan2005/JPN	AB429090	+	+	+	+	G I	5.41×10 ⁶	F	3	3	+					
2005	Kumamoto13/Nov2005/JPN	AB429091	+	+	+	+	G I	5.95×10 ⁵	F	7	6	+					
	Kumamoto14/Nov2005/JPN	AB429092	+	+	+	+	G I	1.73×10 ⁶	M	1	8	+					
	Kumamoto15/Dec2005/JPN	AB429093	+	+	+	+	G I	2.84×10 ⁶	M	7	6	+					
	Kumamoto16/Dec2005/JPN	AB429094	+	+	+	+	G I	7.58×10 ⁷	M	4	7	+					
	Kumamoto17/Dec2005/JPN	AB429095	+	+	+	+	G I	2.40×10 ⁶	F	1	6	+					
	Kumamoto18/Dec2005/JPN	AB429096	+	+	+	+	G I	4.52×10 ⁹	M	7	7	+				NoV (GI)	
	Kumamoto19/Sep2006/JPN	AB429097	+	+	+	+	G I	4.54×10 ⁹	F	2	7	+					
2006	Kumamoto20/Nov2006/JPN	AB429098	+	+	+	+	G I	3.06×10 ⁸	M	4	9	+					
	Kumamoto21/Nov2006/JPN	AB429099	-	+	+	+	G V	8.35×10 ⁹	F	3	7	+					
	Kumamoto22/Dec2006/JPN	AB429100	+	+	+	+	G I	1.86×10 ⁹	F	3	9	+					
	Kumamoto23/Dec2006/JPN	AB429101	+	+	+	+	G II	7.63×10 ⁹	M	3	4	+					
	Kumamoto24/Dec2006/JPN	AB429102	+	+	+	+	G I	4.92×10 ⁹	F	4	5	+					
	Kumamoto25/Dec2006/JPN	AB429103	+	+	+	+	G I	1.19×10 ⁸	M	2	7	+					
	Kumamoto26/Dec2006/JPN	AB429104	+	+	+	+	G II	-	F	0	9	+					
	Kumamoto27/Dec2006/JPN	AB429105	-	+	+	+	G II	9.64×10 ⁹	F	2	8	+					
	Kumamoto28/Dec2006/JPN	AB429106	-	+	+	+	G II	4.22×10 ⁹	M	3	1	+					
	Kumamoto29/Dec2006/JPN	AB429107	+	+	+	+	G I	1.50×10 ⁹	F	6	5	+					
2007	Kumamoto30/Jan2007/JPN	AB429108	+	+	+	+	G I	6.08×10 ⁹	M	4	5	+					
	Kumamoto31/Sep2007/JPN	AB429109	-	+	+	+	G IV	6.60×10 ⁹	M	4	10	+					
	Kumamoto32/Oct2007/JPN	AB429110	-	+	+	+	G IV	4.87×10 ⁹	M	4	11	+					
	Kumamoto33/Oct2007/JPN	AB429111	-	+	+	+	G IV	3.23×10 ⁹	M	9	6	+					
	Kumamoto34/Oct2007/JPN	AB429112	-	+	+	+	G IV	3.79×10 ⁹	M	8	2	+					
	Kumamoto35/Oct2007/JPN	AB429113	-	+	+	+	G IV	4.12×10 ⁹	F	6	1	+					
	Kumamoto36/Oct2007/JPN	AB429114	-	+	+	+	G IV	4.75×10 ⁹	M	2	0	+					
	Kumamoto37/Oct2007/JPN	AB429115	-	+	+	+	G IV	7.42×10 ⁸	M	1	11	+					
	Kumamoto38/Oct2007/JPN	AB429116	-	+	+	+	G IV	8.45×10 ⁹	M	6	11	+					
	Kumamoto39/Oct2007/JPN	AB429117	-	+	+	+	G IV	1.01×10 ¹⁰	F	4	6	+					
	Kumamoto40/Oct2007/JPN	AB429118	-	+	+	+	G IV	1.19×10 ⁹	M	2	8	+					
	Kumamoto41/Oct2007/JPN	AB429119	-	+	+	+	G IV	4.09×10 ⁹	F	1	3	+					
	Kumamoto42/Oct2007/JPN	AB429120	-	+	+	+	G IV	2.86×10 ⁹	M	2	0	+					
	Kumamoto43/Nov2007/JPN	AB429121	-	+	+	+	G IV	3.36×10 ⁹	F	2	1	+					
	Kumamoto44/Nov2007/JPN	AB429122	-	+	+	+	G IV	1.75×10 ⁹	M	5	2	+					
	Kumamoto45/Nov2007/JPN	AB429123	-	+	+	+	G IV	4.37×10 ⁹	M	6	4	+					
	Kumamoto46/Nov2007/JPN	AB429124	-	+	+	+	G IV	7.47×10 ⁹	F	1	1	+					
	Kumamoto47/Nov2007/JPN	AB429125	-	+	+	+	G IV	1.93×10 ⁹	F	4	9	+					
	Kumamoto48/Nov2007/JPN	AB429126	-	+	+	+	G IV	5.62×10 ⁹	M	0	1	+					
	Kumamoto49/Nov2007/JPN	AB429127	-	+	+	+	G IV	4.84×10 ⁹	F	2	11	+					
	Kumamoto50/Nov2007/JPN	AB429128	-	+	+	+	G IV	9.49×10 ⁹	F	1	6	+					
	Kumamoto51/Nov2007/JPN	AB429129	-	+	+	+	G IV	1.65×10 ⁹	F	44	5	+					
	Kumamoto52/Nov2007/JPN	AB429130	-	+	+	+	G IV	2.89×10 ⁹	F	1	3	+					
	Kumamoto53/Nov2007/JPN	AB429131	-	+	+	+	G IV	1.03×10 ⁹	M	1	5	+					
	Kumamoto54/Nov2007/JPN	AB429132	-	+	+	+	G IV	1.63×10 ⁹	F	1	1	+					
	Kumamoto55/Nov2007/JPN	AB429133	-	+	+	+	G IV	2.06×10 ⁹	M	8	2	+					
	Kumamoto56/Nov2007/JPN	AB429134	-	+	+	+	G IV	8.51×10 ⁹	F	7	10	+					
	Kumamoto57/Nov2007/JPN	AB429135	-	+	+	+	G IV	1.43×10 ¹⁰	M	2	2	+					
	Kumamoto58/Nov2007/JPN	AB429136	-	+	+	+	G IV	8.30×10 ⁹	F	3	6	+					
Kumamoto59/Nov2007/JPN	AB429137	-	+	+	+	G IV	5.41×10 ⁹	F	8	4	+						
Kumamoto60/Nov2007/JPN	AB429138	-	+	+	+	G IV	1.07×10 ¹¹	F	7	7	+						
Kumamoto61/Nov2007/JPN	AB429139	-	+	+	+	G IV	2.19×10 ⁹	F	8	0	+						
Kumamoto62/Nov2007/JPN	AB429140	-	+	+	+	G IV	4.27×10 ⁹	M	2	2	+						
Kumamoto63/Nov2007/JPN	AB429141	-	+	+	+	G IV	4.26×10 ⁹	F	2	4	+						
Kumamoto64/Nov2007/JPN	AB429142	-	+	+	+	G IV	1.01×10 ¹⁰	M	2	6	+						
Kumamoto65/Nov2007/JPN	AB429143	-	+	+	+	G IV	5.11×10 ⁹	M	13	5	+						
Kumamoto66/Nov2007/JPN	AB429144	-	+	+	+	G IV	9.18×10 ⁹	M	3	8	+						
Kumamoto67/Nov2007/JPN	AB429145	-	+	+	+	G IV	3.81×10 ⁹	F	2	2	+						
Kumamoto68/Nov2007/JPN	AB429146	-	+	+	+	G IV	3.11×10 ⁹	F	4	11	+						
Kumamoto69/Nov2007/JPN	AB429147	-	+	+	+	G IV	3.29×10 ⁹	M	5	1	+						
Kumamoto70/Nov2007/JPN	AB429148	-	+	+	+	G IV	4.54×10 ⁹	M	7	10	+						
Kumamoto71/Nov2007/JPN	AB429149	-	+	+	+	G IV	5.77×10 ⁹	M	5	10	+						
Kumamoto72/Dec2007/JPN	AB429150	-	+	+	+	G IV	6.96×10 ⁹	F	2	0	+						
Kumamoto73/Dec2007/JPN	AB429151	-	+	+	+	G IV	2.55×10 ⁹	F	7	7	+						
Kumamoto74/Dec2007/JPN	AB429152	-	+	+	+	G IV	3.25×10 ⁹	F	8	5	+						
Kumamoto75/Dec2007/JPN	AB429153	-	+	+	+	G IV	2.93×10 ⁹	M	7	6	+						
Kumamoto76/Dec2007/JPN	AB429154	-	+	+	+	G IV	1.32×10 ⁹	M	6	1	+						
Kumamoto77/Dec2007/JPN	AB429155	-	+	+	+	G IV	4.43×10 ⁹	M	4	1	+						
Kumamoto78/Dec2007/JPN	AB429156	-	+	+	+	G IV	2.50×10 ⁹	F	8	3	+						
Kumamoto79/Dec2007/JPN	AB429157	-	+	+	+	G IV	5.52×10 ⁹	F	6	2	+						
Kumamoto80/Dec2007/JPN	AB429158	-	+	+	+	G IV	9.33×10 ⁹	M	9	11	+						
Kumamoto81/Dec2007/JPN	AB429159	-	+	+	+	G IV	8.04×10 ⁹	M	3	10	+						

a. primers with 580 and 171, polyoma region (Yip et al., 2005)

b. primers with 5x120, 5x121, 5x122, and 5x123, polyoma-capsid junction (Oka et al., 2006)

c. primers F132/F4, R131/R14 as a first PCR, and the F22 and R2 as second PCR, capsid region (Chada et al., 2006)

d. primers F132/F4, R131/R14 as a first PCR, and the F22 and G18, G28, G48, and G58 as second PCR, capsid region (Oka et al., 2006)

e. genogrouping based on the partial capsid sequences (Faruk et al., 2004)

f. ^g is highly diarrhea

g. higher than 17.0 Angers

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：ノロウイルス（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、遺伝子群 I (GI) に属する 5 遺伝子型から 5 株、遺伝子 II (GII) に属する 8 遺伝子型から 11 株、計 13 遺伝子型 16 株の NoV Virus-like particles (VLPs) を用い、Biacore および ELISA 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、NoV が血液型抗原のタイプ 1、2 構造の違いを認識していることが明らかとなった。タイプ 2 が赤血球上に発現しているのに対し、タイプ 1 は NoV が感染の標的とする小腸上皮に発現している。血液型抗原が NoV の感染部位を決定している可能性がある。

A. 研究目的

NoV はヒト小腸上皮に感染し、下痢を引き起こす。NoV は小腸上皮に発現する血液型抗原に吸着するが、結合に重要な糖鎖構造は明らかになっていない。また、NoV が血液型抗原のタイプ間の違いを識別するかどうかも明らかになっていない。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的とする。今年度は、NoV がタイプ 1、2 構造の識別を行っているかどうかを検討した。

B. 研究方法

GI に属する 5 遺伝子型から 5 株、GII に属する 8 遺伝子型から 11 株、計 13 遺伝子型 16 株の NoV VLPs を用いた。4 種類の Monovalent 糖鎖、GalNAc α 1-3(Fuc

α 1-2)Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-R (A type 1)、Gal α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-R (B type 1)、GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-R (A type 2)、および Gal α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-R (B type 2) (R, biotin) と、VLPs との結合を Biacore および ELISA で検出した。

C. 研究成果

1) Biacore では糖鎖を固定したチップ上に VLPs を 20 μ l/min にて 120 秒間流し、結合をモニターした。16 株中 6 株 (6 遺伝子型) の VLP と糖鎖との結合を検出した。A 抗原に結合した 6 株はいずれも、その結合速度はタイプ 1 よりタイプ 2 の方が高く、B 抗原に結合した 2 株もその結合

速度はタイプ1よりタイプ2の方が高かった。しかし、1株(GII/4 遺伝子型)において、解離速度はタイプ1の方が低く、ウイルス-糖鎖複合体の安定性はタイプ1の方が高いことが示唆された。2) ウイルス-糖鎖複合体の安定性をGII/4株を用いてELISAで確認した。ELISAではプレートに固定された糖鎖へのトータルのVLPs結合量を評価するため、ウイルス-糖鎖複合体の安定性の高い組み合わせのシグナルが強くなる。Biacoreの結果から予測された通り、A抗原、B抗原どちらにおいてもウイルス-糖鎖複合体の安定性はタイプ2よりタイプ1の方が高かった。

3) GII/4 遺伝子型株が、他のクラスターの株に比べ結合できる血液型抗原の種類が多いこと、それぞれの血液型抗原への結合力が強いことがBiacore解析において確認できた。

D. 考察と結論

NoVは血液型抗原のタイプ間の違いを認識していることが明らかとなった。ヒト小腸切片を用いた解析においてVLPs結合部位とタイプ1糖鎖発現部位が一致することが報告されている。血液型抗原がNoVの細胞指向性を左右している可能性がある。また、GII/4株は世界中で流行している株であり、国内における大流行(2004年末、2006年末)においても原因となった株である。しかし、その伝播力についても答えが出ていない。今回の上記3)の結果から、血液型抗原への結合力の強さが重症化に至る原因となり、

また伝播力に結びついている可能性がある。

D. 研究発表

1. 誌上発表

(1) Shirato H, Ogawa S, Ito H, Sato T, Kameyama A, Narimatsu H, Xiaofan Z, Miyamura T, Wakita T, Ishii K, Takeda N: Noroviruses Distinguish between Type 1 and Type 2 Histo-Blood Group Antigens for Binding. *Journal of Virology* 2008;82:10756-10767

(2) 白土東子、武田直和、石井孝司: ノロウイルスと血液型抗原との結合。遺伝子医学 MOCK 11 「臨床糖鎖バイオマーカーの開発-糖鎖機能の解明とその応用」, 192-198, 2008. 株式会社メディカルドゥ

2. 学会発表

(1) 白土東子, 熊谷安希子, 伊藤浩美, 佐藤 隆, 亀山昭彦, 成松久, 成松 幾世, 脇田隆字, 石井孝司, 武田直和「ノロウイルスの結合する糖鎖構造」第12回 日本神経ウイルス研究会 学術集会, 2008年7月、鹿児島

(2) 白土東子, 熊谷安希子, 伊藤浩美, 佐藤 隆, 亀山昭彦, 成松久, 脇田隆字, 石井孝司, 武田直和「ノロウイルスによる血液

型抗原タイプ1、2構造の識別」
第28回 日本糖質学会年会、
2008年8月、つくば

- (3) 白土東子, 熊谷安希子, 伊藤浩
美, 佐藤 隆, 亀山昭彦, 成松
久, 脇田隆宇, 石井孝司, 武田

直和「ノロウイルスによる血液
型抗原の識別」第56回日本ウイ
ルス学会学術集会、2008年10
月、岡山

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 20 年度 協力研究報告書

田中 智之	東方 美保
吉澄 志麿	入谷 展弘
三上 稔之	内野 清子
蛇口 哲夫	飯塚 節子
植木 洋	福田 伸治
田村 務	山下 育孝
篠崎 邦子	船津丸 貞幸
林 志直	岩切 章
吉田 徹也	北元 憲利
滝澤 剛則	

平成 21 (2009) 年 4 月

平成 20 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」

協力研究者 総括報告書

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	蛇口 哲夫	(岩手県環境保健研究センター保健科学部)
研究協力者	植木 洋	(宮城県保健環境センター)
研究協力者	篠崎 邦子	(千葉県衛生研究所)
研究協力者	林 直志	(東京都健康安全センター)
研究協力者	田村 務	(新潟県保健環境科学研究所ウイルス科)
研究協力者	吉田 徹也	(長野県環境保全研究所)
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	入谷 展弘	(大阪市立環境科学研究所 微生物保健担当)
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	山下 育孝	(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	岩切 章	(宮崎県衛生環境研究所微生物部)
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:

4つの研究分野の報告に大別された。

- (1) 食中毒事例では、昨年同様にノロウイルス保有の調理従事者による食材汚染事例が報告された。外国産アサリによるノロウイルス/サポウイルス多重感染も報告された。
- (2) 環境中、特に下水処理施設の流入・放水中のノロウイルスの動態では、一昨年の GII/4 大流行時とは異なり、色々の遺伝子型が検出された。垂下カキの実験系でも同様の成績であった。これらの成績から上流域でのノロウイルスの流行予測には更なる継続調査と解析が求められる。また、感染拡大の大きな環境要因である嘔吐物中のノロウイルスについて、その測定方法の改良や口腔内ケアによる感染予防の重要性が示された。
- (3) ノロウイルス遺伝子解析では、今年度に検出された遺伝子型は、多種類あ

るが GII/4 が、昨年同様に、ドミナント株であった。しかし、過去の大流行の遺伝子型 2006b との比較では、同じクラスターの中に含まれない、或いは塩基配列の変異株が報告されており、新たな変異株の出現が懸念されている。今後の継続した、慎重な解析が求められる。

(4) 食品中からノロウイルス遺伝子検出方法としてパンソルビン・トラップ法が開発されているが、今後、実用化による評価が期待される。サポウイルスによる食中毒事例もあり、研究班として簡便なサポウイルス診断キット開発の可能性が膨らんでいる。また、ノロウイルスの簡便な診断方法は、調理従事者の定期検便等に有用となっている。

A. 研究目的

本研究の目的はウイルス性食中毒の予防に関する研究である。ノロウイルス/サポウイルス、宿主(ヒト)とそれを媒体する食材、環境媒体等の三角関係の中で因果関係を究明し、その科学的事実から、感染経路、ウイルス学的特徴、さらに食材・環境媒体等からいかにして迅速・正確にウイルスを検出し感染予防に寄与するかが大きな課題といえる。

全国のサーベイランス拠点として18名の研究者に協力依頼し、ウイルス性食中毒の実態、予防対策に向けた研究を行った。研究協力者の研究内容は、次のカテゴリーに四大別できる。

- (1) 食中毒事例に関与するノロウイルス/サポウイルスの頻度、感染経路、ウイルス遺伝子学的特徴。
- (2) 環境中におけるノロウイルス汚染実態とヒト感染事例との関連、予防対策。
- (3) 食中毒事例、環境由来ウイルス遺伝子の詳細な分子疫学的解析。
- (4) 食材からノロウイルス/サポウイルスの検出方法の改良や迅速な

診断方法の開発・改良。

これらの4点の研究成果に焦点を合わせて総括してみる。

B. 研究材料と方法

研究材料には、散発発生・集団発生時の感染者の臨床材料、カキ等の食材、環境水や室内ダスト等の環境材料を用いた。

研究方法は、従来の方法に従い、ノロウイルス遺伝子の検出・定量・キャプシド、ポリメラーゼ領域の塩基配列の解析・系統樹作成を行い、遺伝子型別の決定、相同性を比較した。

環境材料を用いたウイルス遺伝子検出方法は改良し、また、サポウイルス研究ではサポウイルス中空粒子を用いてモノクローナル抗体の作製を行った。

C. 研究成果

(1) 今年度のノロウイルス流行は2006/2007 流行シーズンに比べ、頻度は著しく減少した。しかし、大小の散発発生、集団発生の健康危機事例の報告は多い。感染経路の中には昨年度の

研究報告と同様に調理従事者を介する事例が後を絶たない(吉澄、三上、林、篠崎、滝澤、岩切)。限られた期間ではあるが、健康調理従事者からは0.2%の頻度でノロウイルスが検出されているが、遺伝子型はGII/2であり、調査以前の流行株と類似株であった(篠崎)。また、食材では中国産冷凍むき身アサリによるノロウイルス/サポウイルス多重感染が報告されている(飯塚)。

遺伝子型では、GII/4が流行主流株と思われるが、流行シーズン前にGIの検出(吉澄)、事例ごとに異なった数種の遺伝子型の検出(山下、三上、滝澤)、また患者年齢層によって遺伝子型分布に差が見られるという注目すべき報告、すなわち、成人層が利用者である施設内流行ではGII/4(91.2%)の検出に対し、保育園等の低年齢層施設ではGII/4(31.6%)、GII/3(20.3%)、GII/13(22.8%)という(林)。

(2) 浄化槽、下水放流水、河川水におけるノロウイルス遺伝子検出が継続して調査・研究されている(蛇口、内野、滝澤、船津丸)。これらの環境検体からはノロウイルスのみならずサポウイルスの検出もあった(滝澤)。検出され遺伝子群はGI、GIIと多数であるが、大流行のあった2006/2007シーズンのGII/4の検出率が突出して高いのに比べ、今年度のような散发発生の多いシーズンでは多種類の遺伝子型が検出された。検体の採取時期の差や検出感度等から、環境検体による流行状況や流行予測は困難ではあるが、

ウイルス遺伝子量の調査から、散发発生患者情報に先行してウイルス量が急増するという調査結果もあり(船津丸)、患者発生の予測や予防対策に資する可能性を含んでいる。また、検出遺伝子の解析は、不顕性感染者の存在や症状の軽重などの流行疫学に有意に役立つものと期待される。

カキの垂下実験では、放流先河川の汚染状況を反映したウイルス遺伝子がカキから検出された。その解析からドミナントのGII/4以外にGI/11の流行があったことも推測している(蛇口)。店頭に入荷された生カキパック水からも遺伝子が検出されている。加工時に汚染水が注入されたか、あるいはカキそのものが汚染されていたかの判定には今後の調査研究が必要である(三上)。また、垂下カキからノロウイルス、サポウイルスG1、G3の検出も報告された(植木)。

一方、環境媒体を解するウイルス汚染の中で、吐物やそれから生じる汚染塵埃による感染は、施設内感染拡大のみならず食材汚染の大きな原因である。

実際の吐物には糞便に匹敵する 10^4 ~ 10^8 コピーのノロウイルス量が検出されること(入谷)、嘔吐後の口腔内には最長20時間まで 10^3 ~ 10^6 コピー数のウイルスの残存が検出された(田村)。また、掃除機内ダストからノロウイルス検出法の検討がされ、SDS-トリス・グリシンバッファが推奨された(吉田)。

(3) 今年度の検出されたノロウイ

ルス遺伝子は、GII/4 が主流株であるが、遺伝子の殆どが GII/4 変異型 2006b であると報告されている(吉澄、福田、山下)。しかし、2006b とは異なるクラスターをもつ遺伝子の検出(吉澄)、GII/4 変異が capsid の P2 ドメインに集中している(福田)、2006b 近縁株の流行(植木)、capsid、polymerase 領域の塩基の変化(岩切)などの報告があり、今後、GII/4 の新たな変異株の誕生が予測されるような遺伝子解析が報告された。

(4) 本研究の主要課題のひとつである食品中からノロウイルス遺伝子の検出には、パンソルビン・トラップ法が昨年から継続して開発・研究がなされ、濃縮法、RNA 抽出法、プライマー設定等に様々な改良が加えられてきた(東方、斉藤分担研究者)。様々な食品にノロウイルスを添加し回収率の検討結果から、13~44 コピーのノロウイルスが検出可能となっている(斉藤分担研究者)。

サポウイルスの食中毒事例では、ウイルス遺伝子検出が主な検出方法であるが(飯塚)、ノロウイルス同様に迅速、簡便なイムノクロマト法の開発が期待される。サポウイルスに対するモノクローナル抗体の作成がなされ、今後の迅速診断方法の構築が期待される。ウイルス性食中毒予防には、調理従業員の健康状態(ノロウイルス保有状況)のモニターリングは重要である。ノロウイルス抗原検出 ELISA 法や迅速診断イムノクロマト法の活用は一つの選択肢でもある。

D. 今後の課題

1. 広域なウイルス性食中毒の疫学的な解析は、食中毒の実態把握のみならずノロウイルスの感染経路の究明、感染拡大防止の構築にきわめて重要であり、今後も継続して調査・研究しなければならない。また、これらの検出情報を共有することは感染予防にとってなくてはならない。
2. その中で原因ノロウイルスの遺伝子型、変異の有無の解析などは、感染力の強さや症状の軽重に大切な情報で、感染拡大防止に直結すると考える。特に、GII/4 では、これまでの変異株とは異なる株の出現に注意し、監視体制をオンの状態しておくべきであろう。また、既存の「カリシネット」のようなシステムをもっと積極的に活用し変異株出現等の情報を広く交換すべきである。
3. 食品中のノロウイルス検出は、出来るだけ多くの検体収集と共に普遍化に勤め、実用性を高めていく必要がある。
4. 口腔ケアの重要性と特に嘔吐後の口腔ケアは重要な感染拡大防止対策として、公衆衛生行政に発信すべきと考える。また、ノロウイルス感染シーズンでは施設内ダストの定期的な検査は施設内感染予防に繋がる一つの対策として、広く勧奨すべきと考える。
5. サポウイルス迅速診断キットは来年度中には実用化し、広域な検査と共に感染実態の把握に努める必要

があるを考える。

平成20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

2008年度に北海道で発生したノロウイルスによる集団胃腸炎事例について

協力研究者 吉澄志磨（北海道立衛生研究所）
協力研究者 石田勢津子、三好正浩（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）

研究要旨：

北海道において2008年4月から2009年1月までに発生したノロウイルスによる集団胃腸炎60事例を対象として、胃腸炎患者から検出されたノロウイルスについての分子疫学的解析を行った。2008年4～7月はGI検出頻度が非常に高く、発生した18事例のうち11事例（61%）からGIが検出された。10月及び11月にもGI/3が5事例から検出されたが、11月以降の検出遺伝子型は、高校生以下の年齢層の事例でGII/3、GII/4及びGII/6、成人の事例ではGII/4が主流であった。GII/4株についてキャプシド領域の系統樹解析を行ったところ、2008年度に検出された36株中35株は、EU2006b variantであるNijmegen115/2006/NL（EF126966）と同じクラスターに分岐した。しかし、ポリメラーゼ領域の系統樹解析では、そのうち11株が、これまで北海道において検出されたEU2006bタイプとは異なるクラスターを形成した。2009年1月に小学校の事例から検出された1株のみ、これまでのGII/4株とは異なる分岐をみせ、Apeldoorn317/2007/NL（AB445395）に近縁であった。

2008年度に発生した60事例のうち、食中毒は2事例であった。そのうち1事例は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、発症者及び調理従事者から検出されたノロウイルスの塩基配列は一致、遺伝子型はGII/4であった。もう1事例はカキ酢を原因食品とした事例であり、原因食品原材料の同一ロット製品から検出されたノロウイルスの塩基配列は、発症者由来のものと一致、遺伝子型はGII/4であった。同一ロット製品のカキのノロウイルス陽性率は81%（13/16）であり、カキ1個当たりのノロウイルス量は675～7473コピーであった。

A. 研究目的

ノロウイルスによる食中毒について、そのリスク評価に必要な基礎デー

タの収集を目的とし、2008年度に北海道において発生した食中毒事件を対象に、発症者、調理従事者、厨房等の拭き取り検査及び食品検査を行った。

また、食中毒発生の背景として、ノロウイルスの流行状況の把握が必要であると考えられることから、ヒト-ヒト感染（以下、感染症）による集団胃腸炎事例も含め、胃腸炎患者から検出されたノロウイルスについての分子疫学的解析を行った。

B. 研究方法

1. 検査対象

北海道において 2008 年 4 月～2009 年 1 月に発生し、当所におけるウイルス検査によりノロウイルス遺伝子が検出された集団胃腸炎 60 事例（糞便 524 検体、吐物 1 検体、食品 5 検体及び拭き取り 22 検体）を対象とした。対象事例の内訳は、食中毒 2 事例（原因施設：事業所内給食施設 1 事例、飲食店 1 事例）、感染症等 58 事例（発生施設：高齢者施設 16 事例、保育所・幼稚園 13 事例、小学校 9 事例、飲食店・会合 6 事例、社会福祉施設 5 事例、中学・高校 4 事例、医療機関 3 事例、宿泊施設 2 事例）であった。

2. 検査方法

(1) 検体の前処理

a. 糞便及び吐物

吐物はそのまま、糞便は滅菌蒸留水を用いて 10%乳剤を作製し、3,000rpm で 20 分間粗遠心後、上清をさらに 10,000rpm で 10 分間遠心した。その上清 140 μ l を RNA 抽出用の材料とした。

b. 食品

野菜は PBS10ml で表面を洗浄、

その他のものは PBS を用いて 10%乳剤を作製し、10,000rpm で 20 分間遠心した上清をポリエチレングリコール沈殿法で濃縮した。ペレットを滅菌蒸留水（表面洗浄のもの 140 μ l、10%乳剤のもの 280 μ l）で再浮遊させ、140 μ l を RNA 抽出用の材料とした。

カキは、中腸腺に等量の PBS を加え、細胞破砕機（安井器械）を用いて 50%乳剤を作製した。中腸腺 1g 当たり 25mg の α -アミラーゼ（和光純薬）を加え、37℃の孵卵器内で攪拌しながら 1 時間の消化処理を行った後、10,000rpm で 20 分間遠心した上清 280 μ l を RNA 抽出の材料とした。

c. 拭き取り

拭き取り液全量をポリエチレングリコール沈殿法で濃縮し、そのペレットに滅菌蒸留水 140 μ l を加えて再浮遊させたものを RNA 抽出に使用した。

(2) ノロウイルス遺伝子の検出と遺伝子型の同定

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 のプライマーには、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。食品及び拭き取り検体については、さらに、ポリメラーゼ領域増幅用に P1/P2

及び Y1/Y2 を、キャプシド領域増幅用に G1-SKF/G1-SKR 及び G2-SKF/G2-SKR を用いた nested PCR を行った。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、片山らの方法に従い、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。系統樹解析は、ClustalX を用いた近隣結合法により行った。

(3) ノロウイルス遺伝子のコピー数の測定

食品及び拭き取り検体のうち、RT-nested PCR 法でノロウイルス遺伝子が検出された検体について、影山らの方法に準じリアルタイム PCR 法により、ノロウイルス遺伝子のコピー数の測定を行った。TaqMan Gene Expression Master Mix (ABI) を用い、プライマーには COG1F/COG1R 及び COG2F、ALPF/COG2R を、プローブは RING1-TP(a)、RING1-TP(b) 及び RING2AL-TP を使用した。

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

(1) シーズン間の比較

過去 5 シーズン (2004/05 ~ 2008/09 シーズン) のノロウイルスによる集団胃腸炎事例数を、図 1 に示した。2008/09 シーズンは 1 月までの集計結果であることから、シーズンの始まりから 1 月までの事例数を過去 5 シーズンで比較してみると、

2004/05 シーズンから 2008/09 シーズンまで、それぞれ 71、62、194、95、42 事例であり、2008/09 シーズンの事例数は、最近 5 シーズンの中で最も少なかった。また、同様にシーズン終盤 (4 月 ~ 8 月) の事例数を比較してみると、2004/05 シーズンから 2007/08 シーズンまで、それぞれ 12、18、15、18 事例であり、2008/09 シーズンの前 ; 2007/08 シーズンの終盤に発生した事例数については、例年と大きな違いは見られなかった。

(2) 2008 年度に発生した事例

2008 年度のノロウイルスによる集団胃腸炎事例について、食中毒と感染症・その他の事例の月別発生数を、図 2 に示した。この期間内で集団胃腸炎事例の発生が確認されなかった月は、8 月と 9 月のみであった。2008 年度に発生が認められた 60 事例のうち、食中毒事例は 2 事例のみであり、4 月と 12 月に 1 事例ずつ発生した。

2. 食中毒事例

2008 年度に発生した食中毒 2 事例の検査結果について、表 1 に示した。

(1) 事例 1

初発は 2008 年 4 月 10 日。原因施設は事業所内の給食施設であり、この施設で調理された弁当を喫食した事業所職員 114 名中 63 名が、下痢や嘔吐等の胃腸炎症状を示した。発症者 15 名及び給食施設の調理従事者 6 名の糞便について、RT-PCR 法

を用いたノロウイルス検査を行ったところ、発症者 13 名及び調理従事者 1 名からノロウイルス遺伝子が検出された。発症者と調理従事者から検出されたノロウイルス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。食中毒の原因とされた弁当の内容は、チキンハヤシソース、白身魚フライ、カールレタス、スローキャベツ、佃煮、漬物、ご飯であった。このうち前者 4 品目の残品について検査を行ったが、すべてノロウイルス陰性であり、原因食品の特定はできなかった。また、給食施設の厨房内 20 ヲ所（調理台、盛り付け台、まな板 5 枚、包丁、各種取っ手 10 ヲ所、ドアノブ、消毒保管庫）とトイレのドアノブ及び手洗い蛇口の、合計 22 ヲ所の拭き取り検体についても検査を行ったが、すべてノロウイルス陰性であった。

(2) 事例 2

初発は 2008 年 12 月 14 日。原因施設は飲食店であり、この飲食店を利用した 1 団体 9 名中 5 名が胃腸炎を発症した。飲食店の当日の利用客は、当該団体を含め、4 団体 43 名及び個人客 1 名（持ち帰り）であったが、他の利用客からの有症苦情はなかった。当所において、発症者 5 名の検体（糞便 4 検体、吐物 1 検体）及び調理従事者 3 名の糞便について検査を行ったところ、発症者全員と調理従事者 1 名の検体からノロウイ

ルス遺伝子が検出された。発症者と調理従事者から検出されたノロウイルス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。当日の利用客のうち当該団体のみに提供されたメニューは 4 品目（牛肉陶板焼き、つぶの刺身、カキ酢、和え物）であった。このうち、カキ酢を喫食した 6 名中 5 名が発症、食べなかった 3 名は症状を示さなかった。また、ノロウイルス陽性となった調理従事者は当該団体に提供したカキ酢を喫食しており、当該団体の発症者と同じ時期に胃腸炎を発症していた。このカキ酢の原材料と同じロットの製品（むき身パック詰め生食用カキ、北海道産）について残品が確保できたため、RT-nested PCR 法によるノロウイルス検査に供した。その結果、検査に用いたカキ 4 プール（中腸腺 3 個/プール）すべてからノロウイルス遺伝子が検出された。カキから検出されたノロウイルスの遺伝子型は GII/4 であり、塩基配列は、発症者及び調理従事者のものと 100%一致した。以上、疫学状況とノロウイルス検査の結果から、原因食品はカキ酢であると結論づけられた。

食中毒の原因食品のノロウイルス汚染状況を確認するため、同一ロット製品のカキ 16 個について、個別に、RT-nested PCR 法とリアルタイム PCR 法によるノロウイルス検査を行った。RT-nested PCR 法では 16

個中 13 個 (81%) からノロウイルス遺伝子が検出され、シークエンスの結果、遺伝子型はすべて GII/4 であった。13 個中 12 個のカキから検出されたノロウイルス遺伝子の塩基配列は、発症者から検出されたものと 100%一致し、残り 1 個はキャプシド領域が 1 塩基違い(同義置換)であった。リアルタイム PCR 法では、GI 遺伝子は全検体とも検出限界以下であったが、GII は 16 検体中 11 検体の実測値 (cDNA 5 μ l 当たりのコピー数) 1 コピー以上の値を示した。この 11 検体のうち、2well ともに実測値が 10 コピー以上を示したのは 9 検体であり、2 検体は 2well とも 1~10 コピーの範囲にあった。これら 11 検体はすべて、RT-nested PCR 法でもノロウイルス遺伝子が検出された。実測値からカキ中腸腺 1 個当たりのコピー数を算出し、コピー数の多いものから順番に並べたものが図 3 である (No. 10 と No. 11 の実測値は 10 コピー以下、それぞれ 6.1 と 4.2)。今回調査を行ったカキパックについては、カキ 1 個当たりに含まれるノロウイルス量は、675~7473 コピーであった。

3. 集団胃腸炎事例から検出されたノロウイルスの遺伝子型

2007/08 シーズンから 2008/09 シーズンへの移行において、検出されたノロウイルス遺伝子型にいくつかの特徴が認められたため、2008 年度内の変化として解析を行った。

(1) 検出された遺伝子型の分布

2008 年度に検出されたノロウイルスの遺伝子型を、発生月別に図 4 に示した。2007/08 シーズン終盤 (4~7月) は GI 検出頻度が非常に高く、発生した 18 事例のうち 11 事例 (61%) から GI が検出された。検出された GI 遺伝子型は GI/3 が最も多く (5 事例)、続いて GI/4 (3 事例)、GI/8 (2 事例)、GI/4 と GI/3 の混合 (1 事例) であった。2008/09 シーズンは、10 月に発生した 2 事例から GI/3 が検出され、11 月には GII と GI/3 の混合事例が 3 事例認められたが、12 月以降はすべての事例から GII が検出された。11 月以降の優勢遺伝子型は GII/4 であり、その他、GII/3 と GII/6 が複数の事例から検出された。また、北海道の集団胃腸炎事例では初めて、GII/19 (GII/299/JPN-EF630529 に近縁) が 2 事例から検出された。

2008 年度における各遺伝子型の施設別検出状況を、2007/08 シーズン (2008 年 4 月~8 月) と 2008/09 シーズン (2008 年 9 月~2009 年 1 月) に分けて、図 5 に示した。高校生より上の年齢層の事例 (社会福祉施設の知的障害者施設 3 事例; GII/4 検出、を含む) では GII/4 の検出頻度が高く、2007/08 シーズンは 60%、2008/09 シーズンは 96% であった。一方、高校生以下の年齢層の事例 (社会福祉施設の高等養護学校; GI/3 検出、児童養護施設; GII/2 検出、の 2 事例を含む) では、2007/08

シーズンは GI の検出頻度が非常に高く、12 事例中 10 事例から GI (GI/3, GI/4 及び GI/8) が検出されたが、2008/09 シーズンは、GII (GII/3, GII/4 及び GII/6) が主流となった。成人の事例に比べて GII/4 の検出頻度は低く、各シーズンそれぞれ 8% 及び 25% であった。

(2) GII/4 株の分類

2008 年度に検出された GII/4 : 36 株について、ポリメラーゼ領域 (P1/P3 間の 286 塩基) 及びキャプシド領域 (ORF2 の N 末端から G2-SKR までの 282 塩基) の系統樹解析を行ったところ、以下の 3 タイプに分類された (図 6)。

- a. 2007/08 シーズンの 5 株 (図 6 に ●-★印で示した株) 及び 2008/09 シーズンの 19 株 (●印) : ポリメラーゼ・キャプシド領域ともに、EU2006b variant である Nijmegen115/2006/NL (EF126966) と同じクラスターに分岐した。
- b. 2008/09 シーズンの 11 株 (○印、北海道では 2008 年 11 月に初めて検出) : キャプシド領域は EU2006b variant である Nijmegen115/2006/NL と同じクラスターに分岐したが、ポリメラーゼ領域の系統樹解析では、これまで北海道で検出された GII/4 株とは異なるクラスターを形成した。
- c. 2008/09 シーズンの 1 株 (◎印

及び矢印、2009 年 1 月に発生した小学校事例から検出) : ポリメラーゼ・キャプシド領域ともに、これまで北海道で検出された GII/4 株とは異なる分岐をみせた。キャプシド領域の塩基配列は Apeldoorn317/2007/NL (AB445395) に近縁であり、ポリメラーゼ領域の塩基配列は b の 11 株に近縁であった。

D. 考察

1. 2008 年度のノロウイルスの流行状況

2007/08 シーズン終盤は、発生事例数は例年と大きな違いはなかったが、流行遺伝子型には特徴があった。2007/08 シーズン全体の特徴として、GI 検出事例数が 28 事例と、例年の 2 ~ 9 事例に比べ多かったことがあげられるが、特にシーズン終盤の 4 月以降は GI 検出頻度が非常に高く、18 事例中 11 事例 (61%) から GI が検出された。GI が検出された 11 事例のうち 10 事例は高校生以下の年齢層の事例であり、この時期にこの年齢層の施設で発生した事例 (12 事例) の 83% から GI が検出されるという結果となった。2008/09 シーズンの初めにも、幼稚園と児童養護施設において、2007/08 シーズン終盤に検出頻度の高かった GI/3 が検出された。しかし、GI/3 の検出は 11 月に発生した保育所と幼稚園の 3 事例で終息し、高校生以下の年齢層ではその後、GII/3, GII/4 及び GII/6 が主流となった。高校生より上の年齢層では年間を通して GII/4 が優勢であり、GII/4 の検出頻度は、小児