

表2 NVが検出された集団発生事例

事例NO	発生年月日	原因施設	感染経路	喫食者数 (入所者)	発病者数	NV陽性数/検査数				遺伝子型 (例数)
						患者	従事者	食品	拭取り	
①	08.3.20	飲食店	会席料理	13	9	6/6	1/4		0/15	GI/8 (4) (患3、従事1)
②	08.4.26	結婚式場	オードブル	87	50	5/5	0/6			GII/13 (5)
③	08.5.10	旅行中	感染症	113	30	8/8				GII/4 (8)
④	08.12.9	葬儀場	感染症	39	11	6/6	0/16		0/12	GII/4 (5)
⑤	08.12.10	特別養護老人施設	夕食 感染症	58	14	4/14 4/5		13/36 1/6	1/12	(黄色ブドウ球菌) GII/1 (4)
⑥	09.1.2	特別養護老人施設	感染症	80	37	11/12	0/10		0/6	GII/4 (7)
⑦	09.1.29	介護老人保健施設	夕食	73	23	5/6	3/4	1/6	0/4	GII/

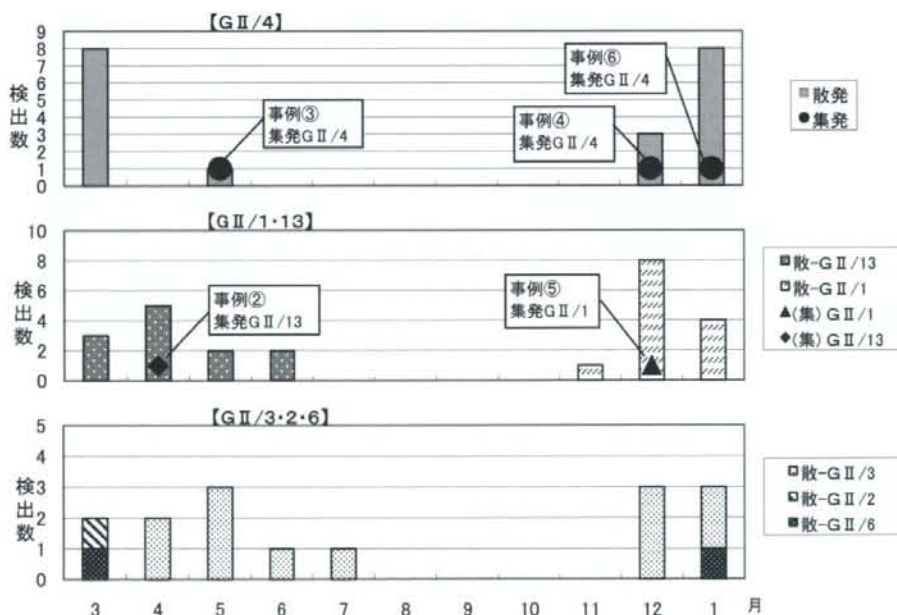


図2 月別の遺伝子型別検出状況



図3 散发例及び集団発生例から検出された NVGI の系統樹 (Cap 領域)



図4 散发例及び集団発生例から検出された NVGII の系統樹 (Cap 領域)

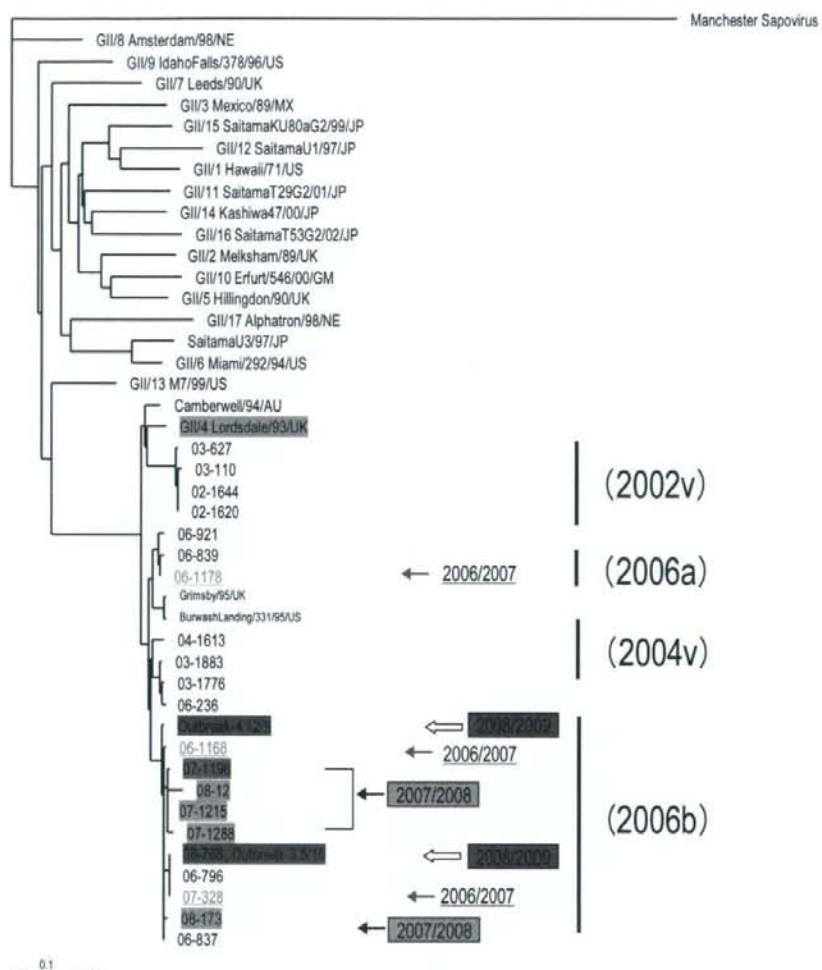


図 5 NVGII/4 の遺伝子型

平成 20 年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全・安心確保推進研究事業）  
「食品中のウイルスの制御に関する研究」  
分担研究報告書

## 下水処理施設流入水におけるウイルス（ノロ、アストロ、アィ、サボ）の消長

分担研究者 田中智之（堺市衛生研究所）  
研究協力者 松津丸貞幸（佐賀県衛生薬業センター）  
増本久人（佐賀県衛生薬業センター）  
南 亮仁（佐賀県衛生薬業センター）

### 研究要旨

2006 年 9 月から 2008 年 12 月まで毎月 1 回、計 28 回、下水処理施設流入水を採取してノロウイルスの消長を調査し、2008 年 3 月からはアストロウイルス、アイチウイルス、サボウイルスを調査対象に加えた。

下水流入水のノロウイルス（以下、NV）は、2006 年及び 2007 年は Genogroup I（以下、GI）及び Genogroup II（以下、GII）のいずれか、あるいは両方が 1 年を通じて検出されたが、2008 年の 9 月及び 10 月はいずれも検出されなかった。GI の遺伝子型は GI/2 型、GI/4 型、GI/8 型の 3 種類であった。一方 GII では GII/2 型、GII/3 型、GII/4 型、GII/5 型、GII/7 型、GII/13 型、GII/17 型の 7 種類であった。流行期においては GII/4 型が主要な流行型であったが、非流行期では遺伝子型に多様性が見られた。アストロウイルス及びサボウイルスは検出されたが、アイチウイルスは検出されなかった。

下水中の NV 検出状況は上流域の NV 感染症発生状況を反映していることが確認され、住民への衛生管理徹底を促す流行前の注意喚起資料となり得る。

### A 研究目的

経口感染する腸管系ウイルスは、感染者の糞便から排泄され下水を経て海水を汚染し、その海域に生息するカキ等に蓄積されることが知られている。また最近では、ノロウイルス（以下、NV）における「ヒト→ヒト」感染の存在が注目されている。

我々は 2006 年 9 月から下水流入水における NV の消長を調査してきた。その結果、下水中の NV 検出状況は流入上流域の NV 感染症発生状況を反映しているとの結果を得た。

今回、NV 以外のアストロウイルス（以下、AstV）、アイチウイルス（AiV）、サボウイルス（SaV）を調査対象に加え、これらの消長を調査することを目的として行った。

### B 研究方法

#### 1 材料

##### 1) 下水処理施設における流入水

下水処理施設は佐賀県南部の有明海の面する A 市の西部に位置し、処理方法は標準活性汚泥法により行われ、塩素処理（0.05～0.1ppm）後、近くの河川へ放流されている。処理の対象人口は約 166 千人、

下水道普及率は約 70% である。

採水は 2006 年 9 月から 2008 年 12 月まで、毎月下旬に流入水について行い、計 28 検体を用いた。

##### 2) 感染性胃腸炎患者

2006 年～2008 年を調査した。

集団発生事例からのウイルス検出は、保健福祉事務所（保健所）から検査依頼があった患者（以下、集団患者）便等を用いた。

散发事例は佐賀県感染症動向調査における定点あたりの感染性胃腸炎患者（以下、散发患者）報告数を集計するとともに、病原体定点から送付された患者便を用いた。

### 2 ウイルス検索

#### 1) 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 を抽出した。RT-PCR は、NV（1SK-F/G1SK-R, G2SK-F/G2SK-R, G2SKF/G2ALSKR）、AstV（Mon269/ Mon270）、AiV（C6261/C6779）、SaV（SV-F11/SV-R1）の各増幅プライマーを行った。その後、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、系統解析を行った。ノロウイルスは 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 システムプライマーと RING TaqMan Probe を用いたリアルタイム PCR 法を用いた。なお、NVRNA 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 (2008 年)

2008 年に下水流入水から検出された NV は、GI の遺伝子型は、GI/4 型 (HU/NLV/Valetta/9 系統) のみであり、1 月から 6 月までと 11 月及び 12 月に検出された (表 1 及び図 2)。

GII では 6 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 型で、1 月から 3 月、7 月、12 月に検出された。この GII/4 型は、2006 年シーズンに世界的に流行した変異株である 2006b 系統で、ひとつのクラスターを形成していた。GII/4 型以外の遺伝子型は、GII/2 型 (SnowMountain/96/US 系統) が 6 月に、GII/3 型 (Arg320/98/AR 系統) が 8 月に、GII/7 型 (Lees/90/UK 系統) が 11 月に、II/13 型 (M7/99/US 系統) が 4 月及び 5 月に、GII/17 型 (Alphatron/98 系統) が 3 月、4 月及び 12 月に検出された (表 1 及び図 3)。

9 月及び 10 月は GI、GII いずれも検出されなかった。

### 2) ノロウイルスの定量 (2008 年)

GI における流入水中の NVRNA 量は  $10^{1.8} \sim 10^{3.2}$  であり、6 月から 10 月では定量限界以下であった。GII では  $10^{1.9} \sim 10^{4.3}$  であり、GI に比較して多い傾向を示し、7 月から 10 月までは定量限界以下であった (図 1)。

### 3) 3 年間の比較

GI の遺伝子型は 2006 年では GI/4 型に加えて GI/2 型及び GI/8 型が検出されているが、2007 年、2008 年はすべて GI/4 型であった。2006 年における GII の遺伝子型はすべて GII/4 型であったが、2007 年は GII/2 型、GII/4 型、GII/5 型、GII/7 型、GII/13 型の 5 種類、2008 年は II/2 型、GII/3 型、GII/4 型、GII/7 型、GII/13 型、GII/17 型の 6 種類であった (表 1)。

NVRNA 量は、3 年間ともに GI に比し GII が高い傾向にあった。流行期の 12 月の GII では 2006 年は  $10^{3.7}$ 、2007 年には  $10^{3.9}$  であり、2008 年は  $10^{4.3}$  と多かった。一方、流行間期である 4 月から 7 月に GI、GII ともに、あるいはいずれか一方が  $10^{1.7} \sim 10^{2.2}$  検出された。(図 1)。

### 4) アストロウイルス、アイチウイルス、サポウイルスの検出状況

アストロウイルスは、4 月から 8 月までと 11 月及び 12 月に検出され、その遺伝子型は 1b 型、2 型、3 型及び 6 型であった。サポウイルスは 10 月のみ検出された。アイチウイルスは調査期間中に検出されなかった (表 2)。

### 5) 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

2008 年の集団発生患者は飲食店、福祉施設、学校を含む 24 事例であり、佐賀県内発生の食中毒と確定された事例は、3 月の旅館事例の 1 事例のみであった (表 3)。

集団発生施設では GII/4 型が最も多く検出され、GI/4 型や GII/2 型も検出された。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吐瀉物で汚染された廊下等のふき取りからも検出された。また、食中毒疑いの疫学調査では、集団発生日前の発症や発生日の喫食前の発症がみられる事例があった。NV とロタウイルスとの重複感染事例 (GI/4 型と A 群、GII/2 型と C 群) もみられた。

佐賀県の散発患者報告数は、2008 年では 12 月初旬 (48 週) から急速に増加し、12 月中旬 (第 51 週) にピークを迎え、その後、急速に減少した。2007 年に比較して報告のピークは 3 週遅れ、定点あたり患者報告数は約 10 人少なかった。このパターンは全国状況とほぼ同様であったが、(図 4)。

散発患者のウイルス検査数は 29 検体であった。NV は GI/4 型、GII/4 型、GII/13 型、他のウイルスとして A 群ロタウイルス、アデノウイルス、コクサッキーウイルスが検出された (表 4)。

## D 考察

今回、調査した下水処理場における流入水中の NV は、2008 年の 9 月及び 10 月を除き、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では、嘔吐物や施設のふき取りから NV が検出されるとともに集団発生日前の発症や発生日の喫食前の発

症がみられる事例があったことから「ヒト→ヒト」の感染が示唆された。

集団発生事例で優勢であった GII では、2006/7 年及び 2007/8 年シーズンに流行初期から中期まで GII/4 型のみが検出されたが、2008/9 年シーズンの流行期は 3 種類と多様化がみられた。これは 2008/9 年シーズンの流行初期の 9 月及び 10 月には検出されず 11 月における RNA 量も過去 2 年間に比して少なかったことから GII/4 型の活動が不活発であり、他のウイルス型が検出されたものと推定される。しかし、12 月は RNA 量が急激に増加し、GII/4 型による集団発生事例も相次ぎ、散发患者報告数の増加も急峻であった。これらのことは下水中の NV の検出状況が上流域の感染状況を反映しており、ウイルス RNA 量の増加は散发患者報告数の急増に先行し、患者発生数予測の指標になり得ることを改めて示唆する。

GI では GI/4 型が下水流入水からほとんど毎月のように検出され集団発生事例もみられるが、散发患者報告数の変動がほとんどないことから 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。

上記のように NV は Genogroup 別に比較すると、GI と GII では検出状況が異なっており、その要因としてウイルス側の感染効率あるいはヒトへの病原性等が考えられる。

2008 年に追加調査した集団発生例が報告されている SaV は 10 月のみ検出され活発な動きはみられなかった。AstV は調査期間の 9 月及び 10 月を除き検出され、今後、SaV とともにウイルス量を含めて検討を進めたい。

終わりに、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、この結果は感染症発生動向調査報告患者数に加えて、流行前に住民への衛生管理の徹底を促す注意喚起の資料となると考えられる。

## E 結論

- 1 検出された遺伝子型は、GI では GI/2 型、GI/4 型、GI/8 型であり、GII では GII/2 型、GII/3 型、GII/4 型、GII/5 型、GII/7 型、GII/13 型、GII/17 型の 7 種類が検出された。
- 2 流行期を含め最も多く検出された GII/4 型は、2006 年世界的に流行した変異株系統であった。
- 3 NV RNA 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。

- 4 これらの状況は、上流域の NV 感染状況を反映しており、感染症発生動向調査報告患者数に加えて、流行前に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。
- 5 アストロウイルス及びサボウイルスは検出されたが、アイチウイルスは検出されなかった。

## F 研究発表

なし

## G 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 下水流入水中におけるノロウイルスの遺伝子型(2006年9月～2008年12月)

遺伝子型	2006年				2007年												2008年											
	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月
GI/2			■																									
GI/4	■	■			■	■	■		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■					■	■
GI/8				■																								
GII/2											■												■					
GII/3																								■				
GII/4	■	■	■	■		■			■			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■		■				■	■
GII/5								■																				
GII/7							■																			■		
GII/13				■																		■	■					
GII/17																						■	■					■

表2 下水流入水におけるアストロ・アイチ・サポウイルス(2008年)

ウイルス型	遺伝子型	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月
アストロ ウイルス	1d	n.t.	n.t.					■				■	■
	2	n.t.	n.t.	■									
	3	n.t.	n.t.		■	■			■				
	6	n.t.	n.t.					■					
アイチ ウイルス		n.t.	n.t.										
サポ ウイルス	G1	n.t.	n.t.								■		

\*n.t : 未実施

表3 急性胃腸炎集団発生事例の概要(2008年)

発生月	事例番号	発生場所	患者数	発症率 (%)	検査数(陽性数/検体数)				検査結果		
					糞便		拭取り	食品	ノロウイルス遺伝子型		その他のウイルス
					喫食者(患者)	従業員(職員)			GI	GI/II	
1月	1	飲食店(仕出し)	14	55.3	3/4	3/14	0/2	0/1	—	GI/4	—
	2	高齢者福祉施設	11	33.8	4/4	n.t.	n.t.	n.t.	—	GI/4	—
	3	小学校	23	23.5	1/1	n.t.	n.t.	n.t.	—	GI/4	—
2月	4	高校修学旅行(北海道事例)	21	14.8	5/5	n.t.	n.t.	n.t.	—	GI/4	—
	5	小学校	11	17.2	3/4	n.t.	n.t.	n.t.	GI/4	—	—
	6	飲食店(ホテル)	21	21.0	2/3	4/5	n.t.	n.t.	GI/4	—	—
	7	幼稚園	22	24.7	1/1	2/2	n.t.	n.t.	GI/4	—	—
3月	8	福祉施設	18	31.8	n.t.	1/1	n.t.	n.t.	—	GI/4	—
	9 <sup>1)</sup>	飲食店(仕出し)	15	17.8	4/4	8/10	n.t.	n.t.	GI/4(従1)	GI/4(患4, 従5)	—
	10	小学校	11	17.7	3/3	n.t.	n.t.	n.t.	GI/4	—	—
	11	小学校	19	38.0	5/5	n.t.	n.t.	n.t.	GI/4	—	A群ロタ <sup>2)</sup>
4月	12	食品製造施設	21	17.5	3/3	n.t.	0/8	0/4	—	GI/4	—
	13	飲食店	8	25.0	4/4	0/12	n.t.	n.t.	GI/4	—	—
5月	14	小学校	26	25.0	5/8	n.t.	n.t.	n.t.	—	GI/2	C群ロタ <sup>3)</sup>
	15	児童福祉施設	8	13.3	2/2	0/1	n.t.	n.t.	—	—	C群ロタ
6月	16	児童福祉施設	6	60.0	1/1	n.t.	n.t.	n.t.	—	GI/2	—
11月	17	飲食店(ホテル)	149	37.3	8/14	5/17	n.t.	0/5	—	GI/4	—
	18	飲食店	9	50.0	1/2	3/3	n.t.	n.t.	—	GI/4	—
	19	福祉施設	9	7.3	2/4	n.t.	n.t.	n.t.	—	GI/4	—
	20	保育園	35	48.1	1/2	n.t.	n.t.	n.t.	—	GI/4	—
	21	飲食店(ホテル)	40	23.5	3/3	3/18	0/4	0/3	—	GI/4(患3, 従2,) GI/7(従1)	—
12月	22	飲食店	49	55.1	n.t.	3/6	n.t.	n.t.	—	GI/4	—
	23	飲食店(ホテル)	18	34.0	1/1	4/26	1/14	0/5	GI/3(従1)	GI/4(患1, 従4)	—
	24	飲食店(旅館)	6	75.0	2/2	1/6	n.t.	n.t.	—	GI/4	—

\* 1) 事例番号9は食中毒事例、2) A群ロタ(Δ)は1件検出、3) C群ロタ(Δ)は5件検出

\*\* 検査結果の—は未検出、n.t.は未実施、(患)は患者由来、(従)は従業員由来

表4 感染性胃腸炎散発患者事例からのウイルス検出状況(2008年)

月別	検体数	陽性数	内 訳								
			ノロGI		ノロGI/II			その他			
			4型	4型	13型	型不明	ロタAG3型	Ad1型	Ad2型	Ad6型	CA2型
1月	5	3	1	1						1	
2月	8	7	2				5				
3月	5	5					4	1			
4月	2	2	1*		1						1*
5月	1	0									
6月	0	0									
7月	1	1									1**
8月	1	0									1**
9月	0	0									
10月	1	0									
11月	1	1				1					
12月	4	2				2					
計	29	21	4	1	1	3	9	1	1	2	1

\*NVG1/4とAd6型の重感染

\*\*Ad6型とCA2型の重感染



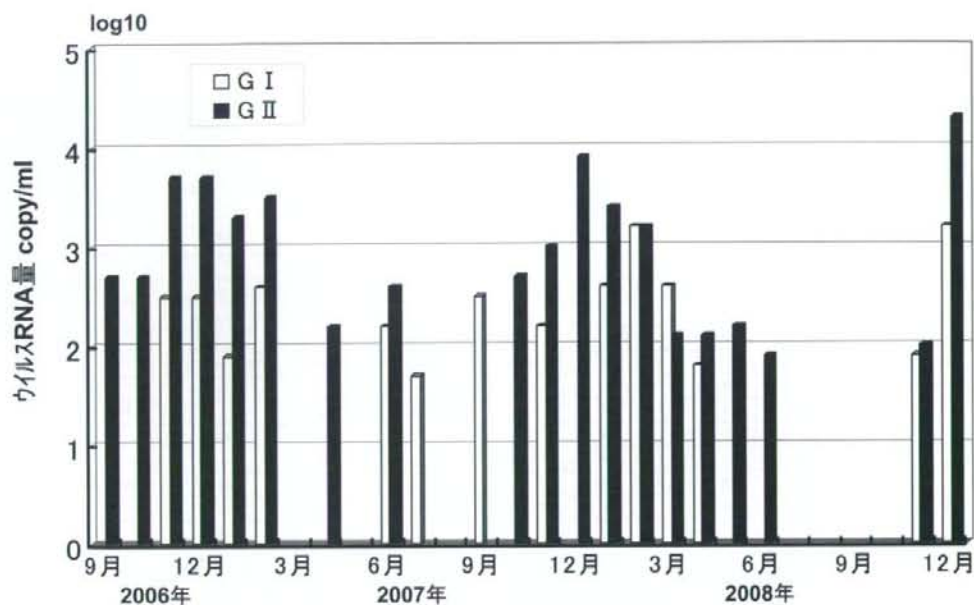


図1 下水流入水中のノロウイルスのRNA量(2006年9月~2008年12月)

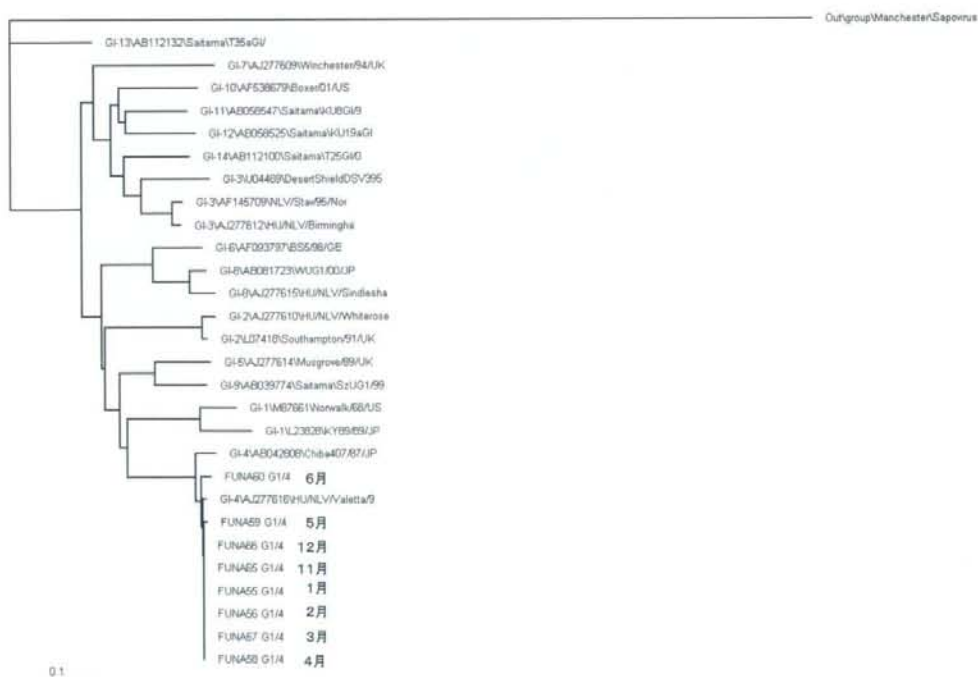


図2 下水流入水から検出されたノロウイルスG1の分子系統樹(2008年)

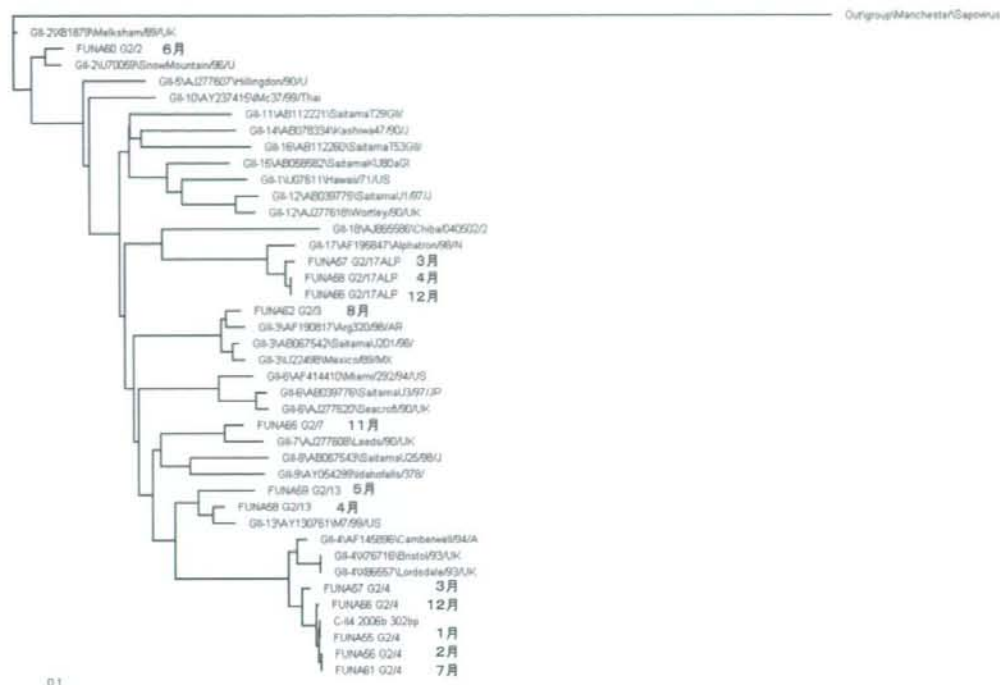


図3 下水流入水から検出されたノウイルスG IIの分子系統樹(2008年)

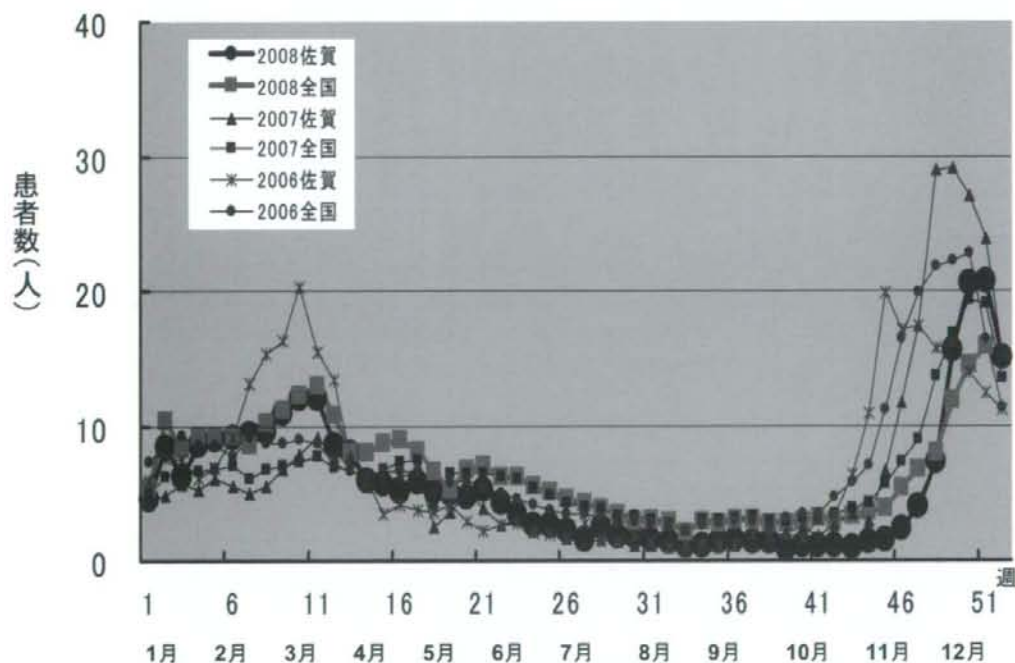


図4 定点あたりの感染性胃腸炎患者報告数の推移  
(2006年～2008年: 佐賀、全国)

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」

協力研究報告書

患者と調理者から検出されたノロウイルスの遺伝子解析—その2

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: 三浦美穂、山本正悟 (宮崎県衛生環境研究所微生物部)

分担研究者: 田中智之(堺市衛生研究所)

**研究要旨:**患者と調理従事者からノロウイルス(NV)が検出された集団嘔吐下痢症の4事例について NV の遺伝子解析を行い、保健所の行う疫学調査への利用の有用性について検討した。その結果、検出された NV の遺伝子解析は疫学調査の補完の意味で有用であることが示唆された。今後も検討事例を重ね、保健所の疫学情報と衛生研究所の遺伝子検査情報を詳細に参照しながら継続して検討していくことで、食中毒の判断根拠の明確化に繋がるものと思われた。

A. 研究目的

患者と調理従事者からノロウイルス(NV)が検出された4事例において、NVの遺伝子解析を行い、保健所の行った疫学調査の結果と参照し、疫学調査への応用の有用性について検討することを目的とした。

B. 研究材料と方法

1. 材料

1) 研究対象の NV 食中毒(疑い)事例  
県内で発生した食中毒(疑い)事例において患者と調理従事者からともに NV が検出された4事例を対象とした。

(事例1):平成20年11月15日に老人福祉施設の入所者10名程度が下痢・嘔吐を呈した。疫学調査の結果、当該施設では入所者の食事を調理する他、同グ

ループの他の施設、特別養護老人ホーム、短期入所施設、グループホーム、デイサービス等の食事を調理・配送しており、9施設で81名が同様の症状を呈していた。保健所の疫学調査で、当該施設で調理した食事が各施設の共通食であること、患者の症状、発症時間が同様であること、さらに複数の施設利用者の検便や嘔吐物から NV が検出されたこと等から、当該施設が提供した食事を原因とする食中毒と断定された。

(事例2):平成20年12月8日に看護専門学校(事例2)の学生食堂を利用した看護学校教職員、隣接された施設の病院職員、介護施設職員等48名が嘔吐、下痢症状を呈した。保健所による疫学調査で、有症者全員が当該施設を利用していること、調理従事者からも NV が検出された

こと等から、当該施設を原因施設とする食中毒と断定された。

(事例3):平成20年12月16日、ホテルの調理施設で調理された食事を食べた3グループの計67名が嘔吐や下痢等の症状を呈した。保健所の疫学調査の結果、当該施設の食事が共通食であること、症状および発症時間が同じであること、調理者と患者便からNVが検出されたこと等から、当該施設で提供された食事を原因とする食中毒と断定された。

(事例4):平成21年1月10~11日に県内で開催された小中学生のバスケットボール大会に参加した児童・生徒関係者約260名が嘔吐下痢症を呈した。保健所の疫学調査の結果、食事食べてないヒトにも有症状者がいること、共通食事を提供した大会関係者以外のグループには有症者が確認されなかったことおよび共通食を食べた調理者と患者から検出されたNVのcapsid領域の塩基配列が100%一致しなかったこと等から集団感染症と断定された。

## 2. 方法

### 1) NVの検出と遺伝子型別

検査方法は、平成15年11月5日付食安監発第1105001号に示されたリアルタイムPCR法により行った。NVの塩基配列の解析のためにPCR反応に用いたプライマーは、capsid領域(COG2F/G2SKR)、polymerase(MR/P3)および篠原等の報告したGII/4類似株を対象とした可変領域(L1F/L7R)を用いた。事例1, 2, 4において可変領域の1st-PCRの結果、充分な量の遺伝子産物が得られなかった一

部の検体についてはnested-PCR法で増幅産物を得て、ダイレクトシーケンシング法により、ABI PRISM 3130 DNA Sequencer (Applied Biosystems)を用いて塩基配列を決定した。得られた塩基配列をもとに、国立遺伝学研究所(DDBJ)のFASTプログラムで相同性検索を行い、CLUSTAL Wを利用してKIMURAのパラメーターでマルチプルアライメントを実施し、neighbor-joining法で系統解析を行った。

## C. 研究結果

### 1. 事例1

4施設の発症者計9名と調理従事者8名から採取した計17検体の便あるいは嘔吐物をリアルタイムPCR法で調べた結果、発症者9/9名と調理者3/8名からNVGIIが検出された。発症者9名から検出されたNV量は、実測値で、 $10^1$ コピー(嘔吐物:1名)、 $10^3 \sim 10^4$ コピー(2名)、 $10^5 \sim 10^6$ コピー(6名)、調理関係者3名は、 $10^3$ コピー、 $10^4$ コピーおよび $10^7$ コピーであった。発症者3名と調理者3名から検出されたNVGII/4類似株計6株のcapsid領域の283nt、polymerase領域の334nt、および可変領域の622ntは100%一致していた。

### 2. 事例2

発症者10名および調理従事者3名とその子供2名の計15名の便をリアルタイムPCR法で調べた結果、発症者10名/10名からNVGII、調理従事者1名/3名からNVGIとNVGII、その子供2名のうち、2歳児からNVGII、7ヶ月例の乳幼児からNVGIとNVGIIが検出された。

患者から検出された NVG II 量の実測値は、 $10^3 \sim 10^4$  コピー (4 名)、 $10^5 \sim 10^7$  コピー (6 名)、調理者から検出された NVG II 量は  $10^5$  コピー、NVG I 量は  $10^2$  コピー、子供からは検出された NVG II 量は  $10^6$  コピー (2 名)、NVG I 量は  $10^1$  コピーであった。発症者 3 名と調理者 1 名とその子供 2 名から検出された NVG II / 4 類似株計 6 株の capsid 領域の 283nt、polymerase 領域の 334nt、および可変領域の 622nt は 100% 一致していた。

更に、事例 1 と事例 2 は隣接した市町村でほぼ同時期に発生した集団発生事例であったため、両事例で検出された NVG II / 4 株計 13 株の capsid、polymerase および可変領域の塩基配列を比較した結果、capsid 領域の 283nt、polymerase 領域の 334nt は 100% 一致しており、可変領域の 622nt のうち 1 塩基のみ異なっていた (図 1)。

### 3. 事例 3

3 つのグループから患者 9 名と調理関係者 23 名から採取した計 30 検体の便をリアルタイム PCR 法で検査した結果、発症者 7 名と調理者 1 名から NVG II が検出された。発症者の NV 検出量は、実測値で  $10^3 \sim 10^4$  コピー (2 名)、 $10^5 \sim 10^7$  コピー (5 名) で、調理者の NV 検出量は  $10^4$  コピーで、従事した日には下痢症状を呈していたことが判明した。患者 7 名と調理者から検出された NVG II 株の capsid 領域の塩基配列の相同性を比較した結果、100% 一致し NVG II / 13 類似株と判定された。事例 1、2 と同様に polymerase 領域の塩基配列の相同性を検索するために、PCR 反応を行ったが、

全ての検体で増幅産物は得られず相同性解析は出来なかった。

### 4. 事例 4

患者 17 名と調理者 9 名の計 26 検体の便をリアルタイム PCR 法で検査した結果、患者 11 名と調理者 1 名から NVG II が検出された。患者の NV 検出量は、実測値で  $10^2 \sim 10^4$  コピー (5 名)、 $10^5 \sim 10^7$  コピー (6 名)、調理従事者の NV 検出量は  $10^6$  コピーであった。調理従事者は患者と同時期かそれ以降に下痢症状を呈していたことが判明した。患者 7 名と調理従事者 1 名から検出された NVG II / 4 類似株計 8 株の capsid、polymerase および可変領域の塩基配列を比較した結果、患者 7 名から検出された NV 計 7 株は、capsid 領域の 285nt、polymerase 領域の 336nt および可変領域の 626nt は 100% 一致した。これに対し、患者 7 名から検出された株と調理従事者から検出された株とは capsid 領域の 285 塩基配列中 2 塩基、polymerase 領域の 336 塩基配列のうち 5 塩基および可変領域の 626 塩基配列中 13 塩基が異なっており、ウイルスの由来が異なることが判明した。(図 2)。

## D. 考察

高齢者施設における NV を原因とする集団嘔吐下痢症事例は、ほとんどがヒト-ヒトによる感染症事例であるが、事例 1 のように、調理従事者を原因とする食中毒では、特に保健所への疫学調査が重要である。患者と調理従事者から検出された NV の遺伝子解析の結果、両者から NVG II / 4 が検出され、塩基配列の解析結果からも調理従事者を原因とする

NV による食中毒であると判断された。今後、原因食品から NV を検出し、塩基配列の相同性を比較解析することが必要である。

事例 2 においては、患者 10 名からは NVG II が検出されたのに対し、調理従事者とその子供からは NVG II と NVG I が検出された。このような事例では、複数の遺伝子型の NV による食中毒の関与が考えられたが、ダイレクトシーケンスによる遺伝子解析の結果では、遺伝学的に同一の NV が検出された。一般に、二枚貝関連嘔吐下痢症の患者からは、複数の遺伝子グループあるいは遺伝子型の NV が検出されることがある。保健所の疫学調査によると、NV が検出された子供の保育園では、嘔吐下痢症が流行していたが詳細な感染源は不明である。調理者から NVG I と NVG II の遺伝子型が検出された場合に、患者から単一あるいは複数の遺伝子型が検出されるかどうかは、今後、事例数を増やし検討する必要がある。

事例 1 と事例 2 は近隣の市町村でほぼ同時期に発生した食中毒事例であることから、両事例で検出された計 13 株の capsid、polymerase および可変領域の計 1239 塩基配列を比較した結果、capsid と polymerase 領域は 100% 一致し、可変領域 1 塩基のみ事例毎に異なっていた。このことから、近隣地域で類似した NV 株が流行していたことが判明した。平成 18 年末に当県内で流行した NVG II / 4 株による集団嘔吐下痢症 9 事例において各事例 1 株ずつ用いて 3 領域の塩基配列の相同性解析を行った結果、院内感染

事例とホテルにおける有症苦情事例で検出された NV で 3 領域とも 100% 一致した株が存在していた。以上のことから、NV の流行時期には、capsid、polymerase および可変領域で類似した塩基配列を持つ NV 株が地域内で流行をしていることを考えなければならない。

事例 3 においては、患者 7 名と調理者から検出された NVG II / 13 類似株は capsid 領域の部分塩基配列が 100% 一致していたことが確認できたが、他の領域の相同性解析は行えず、このような場合は新たにプライマーを設定する必要がある。現在、当所では capsid 領域以外の塩基配列の相同性解析は、NVG II / 4 類似株に関してのみ行っているが、今後、他の遺伝子型についても複数の領域の相同性解析を検討する必要がある。

事例 4 においては、当初、調理者から検出された NV の検出した量が多く、食中毒も疑われ、調理従事者と患者から検出された NV の遺伝子型も同じ NVG II / 4 類似株であったが、capsid 領域の塩基配列の相同性解析の結果、2 塩基が異なっていた。polymerase と可変領域の塩基配列の相同性解析の結果でも、一部の塩基配列が異なっており患者と調理者から検出された株の由来は異なると判断された。保健所の疫学調査の結果でも、詳細な感染経路は不明であるが NV による集団感染症と断定された。感染源の究明や食中毒の行政判断には詳細な疫学調査が極めて重要であるが、capsid 領域の結果で、調理従事者と患者から検出された株の塩基配列が 100% 一致しない事例では、capsid 以外の領域の遺伝子の

相同性解析も有用となることが示された。

## E. 結論

調理関係者を原因とする食中毒事例において、患者と調理関係者から検出された NV 株の複数の領域の遺伝子解析を行うことにより、感染源の究明と保健所の疫学調査への応用に有用であることが示唆された。NV の遺伝子解析には時間を要し、保健所の行う食中毒か感染症かの行政判断には、その場では間に合わないが、更に、多くの事例で保健所の疫学調査結果と検査情報を連携しながら検討することが必要である。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 誌上発表

岩切章、三浦美穂、山本正悟、野田衛：患者と調理者から検出されたノロウイルスの遺伝子解析。平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金 食品中のウイルス制御に関する研究報告書 2008:265-270.

### 2. 学会発表

岩切章、山本正悟：ノロウイルス(NV)の遺伝子解析による疫学調査への有用性の検討。

第 56 回日本ウイルス学会学術集会  
2008 年 10 月 岡山市

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

```

case1(F)      TTATTCAGGTAGAAAATGTCCAAAATGTACACCTAGCCCTGCTGTAGCCCCACTTTTCC
case1         TTATTCAGGTAGAAAATGTCCAAAATGTACACCTAGCCCTGCTGTAGCCCCACTTTTCC
case1         TTATTCAGGTAGAAAATGTCCAAAATGTACACCTAGCCCTGCTGTAGCCCCACTTTTCC
case2         TTATTCAGGTAGAAAATGTACAAAATGTACACCTAGCCCTGCTGTAGCCCCACTTTTCC
case2(C)      TTATTCAGGTAGAAAATGTACAAAATGTACACCTAGCCCTGCTGTAGCCCCACTTTTCC
case1         TTATTCAGGTAGAAAATGTCCAAAATGTACACCTAGCCCTGCTGTAGCCCCACTTTTCC
case2(C)      TTATTCAGGTAGAAAATGTACAAAATGTACACCTAGCCCTGCTGTAGCCCCACTTTTCC
case2         TTATTCAGGTAGAAAATGTACAAAATGTACACCTAGCCCTGCTGTAGCCCCACTTTTCC
case2(F)      TTATTCAGGTAGAAAATGTCCAAAATGTACACCTAGCCCTGCTGTAGCCCCACTTTTCC
case1(F)      TTATTCAGGTAGAAAATGTCCAAAATGTACACCTAGCCCTGCTGTAGCCCCACTTTTCC
case2         TTATTCAGGTAGAAAATGTACAAAATGTACACCTAGCCCTGCTGTAGCCCCACTTTTCC
case2         TTATTCAGGTAGAAAATGTCCAAAATGTACACCTAGCCCTGCTGTAGCCCCACTTTTCC
case1(F)      TTATTCAGGTAGAAAATGTCCAAAATGTACACCTAGCCCTGCTGTAGCCCCACTTTTCC
*****

```

F:調理者、C:子供

図1. 事例1と2で検出されたNV13株の可変領域の相同性解析の結果(一部分を示す)

Capsid 領域	P-1	GGTGCCGCTATTGCGGGCGCTGTAGCGGGCCAACAAAATGTAATTGACCCCTGGATTAGA
	P-2	GGTGCCGCTATTGCGGGCGCTGTAGCGGGCCAACAAAATGTAATTGACCCCTGGATTAGA
	P-3	GGTGCCGCTATTGCGGGCGCTGTAGCGGGCCAACAAAATGTAATTGACCCCTGGATTAGA
	P-4	GGTGCCGCTATTGCGGGCGCTGTAGCGGGCCAACAAAATGTAATTGACCCCTGGATTAGA
	P-5	GGTGCCGCTATTGCGGGCGCTGTAGCGGGCCAACAAAATGTAATTGACCCCTGGATTAGA
	P-6	GGTGCCGCTATTGCGGGCGCTGTAGCGGGCCAACAAAATGTAATTGACCCCTGGATTAGA
	Food Handler	GGTGCCGCTATTGCGGGCGCTGTAGCGGGCCAACAAAATGTAATTGACCCCTGGATTAGA
P-7	GGTGCCGCTATTGCGGGCGCTGTAGCGGGCCAACAAAATGTAATTGACCCCTGGATTAGA	
*****		
Polymerase 領域	P-1	CTCGGTGGGATTCAACACAACAGAGAGCCGTGCTGGCAGCTGCTCTAGAAAATCATGGTTA
	P-2	CTCGGTGGGATTCAACACAACAGAGAGCCGTGCTGGCAGCTGCTCTAGAAAATCATGGTTA
	P-3	CTCGGTGGGATTCAACACAACAGAGAGCCGTGCTGGCAGCTGCTCTAGAAAATCATGGTTA
	P-4	CTCGGTGGGATTCAACACAACAGAGAGCCGTGCTGGCAGCTGCTCTAGAAAATCATGGTTA
	P-5	CTCGGTGGGATTCAACACAACAGAGAGCCGTGCTGGCAGCTGCTCTAGAAAATCATGGTTA
	P-6	CTCGGTGGGATTCAACACAACAGAGAGCCGTGCTGGCAGCTGCTCTAGAAAATCATGGTTA
	P-7	CTCGGTGGGATTCAACACAACAGAGAGCCGTGCTGGCAGCTGCTCTAGAAAATCATGGTTA
Food Handler	CTAGGTGGGATTCAACACAACAGAGAGTGTGCTGGCAGCTGCTCTAGAAAATCATGGTTA	
*****		
可変領域	P-1	GTTATTCAGGTAGAAAATGTCCTAATGTACACCTAGCCCTGCTGTAGCCCCACTTTTC
	P-2	GTTATTCAGGTAGAAAATGTCCTAATGTACACCTAGCCCTGCTGTAGCCCCACTTTTC
	P-3	GTTATTCAGGTAGAAAATGTCCTAATGTACACCTAGCCCTGCTGTAGCCCCACTTTTC
	P-4	GTTATTCAGGTAGAAAATGTCCTAATGTACACCTAGCCCTGCTGTAGCCCCACTTTTC
	P-5	GTTATTCAGGTAGAAAATGTCCTAATGTACACCTAGCCCTGCTGTAGCCCCACTTTTC
	P-6	GTTATTCAGGTAGAAAATGTCCTAATGTACACCTAGCCCTGCTGTAGCCCCACTTTTC
	P-7	GTTATTCAGGTAGAAAATGTCCTAATGTACACCTAGCCCTGCTGTAGCCCCACTTTTC
Food Handler	GTTATTCAGGTAGAAAATGTCCTAATGTACACCTAGCCCTGCTGTAGCCCCACTTTTC	
*****		

P:患者

図2. 事例4で検出されたNV8株のcapsidとpolymeraseと可変領域の相同性解析の結果(一部分を示す)



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  
「食品中のウイルス制御に関する研究」  
協力研究報告書

サポウイルス VLPs に対する単クローン抗体の作製とその解析

研究協力者 北元憲利(兵庫県立大学環境人間学部)  
研究協力者 岡智一郎、Grant S. Hansman、武田直和(国立感染症研・ウイルス第Ⅱ部)  
分担研究者 田中智之(堺市衛生研究所)

研究概要:

これまで、ノロウイルス(Norovirus、NV)様粒子(NV-VLPs)に対する単クローン抗体の(MAbs)をいくつか作製し、MAbs の特性を生かした迅速で簡便、多検体検出可能な NV-ELISA 法の開発を手がけてきた。一方、サポウイルス(Sapovirus、SV)に対しては、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えない。本研究では、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 の作製を試みた。その結果、Genogroup(G)I/1 に対して5クローン、GI/5 に対して3クローン、GII/3 に対して2クローン、GIV/1 に対して2クローン、および GV/1 に対して8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-VLPs を固層化した ELISA 法により各抗体の反応性を調べたところ、株特異的および Genogroup 特異的なクローンがあることがわかった。また、すべての Genogroup の VLPs に交叉する抗体も存在することがわかった。このうち一部の MAbs について、ウエスタンブロット法により反応性を調べたところ、ELISA 法と同様の交叉反応性を示した。

A:研究目的

ヒトカリシウイルスはノロウイルス属(Norovirus、NV)およびサポウイルス属(Sapovirus、SV)に分類され、両者はさらに多数の Genogroup(G)に亜分類されている。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 法などを用いれば、かなり迅速性も増してきているが、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法の開発を手がけてきた。

一方、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ており、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いがたい。本研究では、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目的で、これまでもSV-VLPsに対するMAbsの作製を試み、いくつかの抗体を樹立してきたが、有用な抗体を得るには至らなかった。今回、より有用な抗体を得るために、引き続きMAbsの作製を試み、その解析を行った。

## B: 研究材料と方法

### 1. 材料

免疫源として、バキュロウイルスで発現されたレコンピナントSV-VLPsを用いた。すなわち、GI/1(Mc114株)-、GI/5(Yokote株=Akita株、秋田県健康環境センター・斎藤博之先生より提供)-、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症研において作製された。

### 2. 方法

免疫法として、経口あるいは腹腔投与を行った。細胞融合法は常法に従って行った。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。前回の報告では抗体として培養上清を用いたが、今回は、抗体産生細胞をマウスの腹腔内に接種し、得られた腹水を抗体として用いた。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

表1に示すように、GI/1に対して5クローン、GI/5に対して3クローン、GII/3に対して2クローン、GIV/1に対して2クローン、およびGV/1に対して8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法により各抗体の反応性を調べたところ、

交叉反応性が異なるクローンが存在することが分かった。

### 1) 株特異的なMAbs

VLPs株に特異的な抗体、すなわち、GI/1に対する抗体として4クローン(8318、5011、1325および4357)、GII/3に対する抗体として2クローン(930および1803)、GIV/1に対する抗体として2クローン(819および806)、GV/1に対する抗体として7クローン(6609、4652、1052、563、1496、155および8315)を得ることができた。

### 2) Genogroup 特異的なMAbs

GI/5に対する抗体2クローン(616および630)は、調べた限り2株であるが、GI/1およびGI/5に交叉反応を示すことからGenogroup特異的と考えられた。

### 3) すべてのSV-VLPsと反応するMAbs

GI/5に対する抗体の1つ(8127)は、すべてのGenogroupの株に交叉反応性を示すことがわかった。

### 4) その他のMAbs

2クローン(4732および1011)は株間において、反応の強いものもあれば全く反応しないものもあった。

### 5) ウエスタンブロット法における交叉性

これらのMAbsのうち、一部のMAbsを用いて、ウエスタンブロット法を行ったところ、ELISA法と同様の交叉反応性を示すことが確認された(図1)。

## D: 考察

元来、SV-VLPsはNV-VLPsなどに比較してその産生量が悪いといわれ、それが研究の隘路となっていた。最近しだいその問題も解決されてきたことにより、抗原(免疫源)として利用されるようになってきた。本研究においても、SV-VLPsを免疫源として比較的多くのクローンを得ることができた。

SV の Genogroup 間すべてに交叉反応を示す MABs が得られた。ただ、株の違いにより多少反応性の強弱があり、特に GII に対しては反応性が弱い傾向がみられた。前回、別の時期に作製された同株の GII/3(Syd53)について検討した際にもその傾向がみられ、また、VLPs がハーフサイズに切れやすい傾向がみられている。この MABs は SV の共通領域を認識したとみられるが、その領域は変化しやすいか、discontinuous な領域なのかもしれない。今後、ほ乳動物のペクターで作製された GII-VLPs を使用して検討する予定である。

また、GI に特異性のある抗体を得ることができた。ただし、GI/1 および GI/5 の2株で調べた限りであり、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。Genogroup に特異的な抗体を用いれば、既存のノロウイルスの診断キット(GI および GII を区別)のように Genogroup の鑑別診断に利用することも可能である。Genogroup の異なるいくつかのクローンをカクテルにして利用するのも一案と考えられる(図3)。

今回、得られた多くの MABs は株特異的であった。しかし、抗原としては、GI を除いて、各 Genogroup で1株の VLPしか用いていない。同 group のいくつかの株 VLPs を用いて検討すれば、Genogroup 特異的な抗体が他にも存在する可能性があるかもしれない。株特異性の抗体は、検出・診断としての利用は難しいが、抗原的な解析などには役立つことが期待される。

今後、VLPs の数を増やしたり、臨床材料を用いてこれらの抗体の有用性を検討する必要がある。また、得られた SV-MABs の抗原的解析やエピトープマッピングを行うとともにサポウイ

ルスの ELISA 法あるいはイムノクロマト法などによる検出系を構築し、流行疫学、早期発見および早期予防に寄与したい。

## E: 研究業績

### 1. 論文発表

1) 田中智之、加藤大介、鎌田公仁夫、三好龍也、内野清子、吉田永祥、北元憲利、武田直和: ノロウイルス迅速抗原検査. 検査と臨床 36(3): 235-239, 2008

2) 著書(総説)  
北元憲利. 食品微生物の検出法の最新技術. New Food Industry, 48(3): 11-20, 2006.

### 2. 学会発表

1) Kamata K, Kato D, Mangan K, Gondaira F, Hirano M, Sato S, Sakae K, Kobayashi S, Oseto M, Seto Y, Kitamoto N, Tanaka T and Takeda N.

Development of a New ELISA for Detection of Noroviruses in Stool Specimens. American Society for Microbiology, 106<sup>th</sup> General Meeting, Orlando, USA, May 22-24, 2006.

2) 北元憲利、三好龍也、内野清子、Hansman GS、武田直和、田中智之: サポウイルスに対する単クローン抗体の樹立とその交叉性. 第55回日本ウイルス学会(北海道)、2007年10月

## E: 知的財産の出願、登録状況

### 1. 特許取得

ノロウイルス対外診断 ELISA キット

### 2. 実用新案登録

なし

表1 得られた単クローン抗体の交叉性 (ELISA法による)

	MAb	Antigen(VLPs)				
		GI/1	GI/5	GII/3	GIV/1	GV/1
GI/1(Mc114)	8318	2078	<100	<100	<100	<100
	5011	1248	<100	<100	<100	<100
	1325	1647	<100	<100	<100	<100
	4357	1414	<100	<100	<100	<100
	4732	246	<100	<100	114	1530
GI/5(Akita)	616	1640	2907	<100	<100	<100
	630	1405	3201	<100	<100	<100
	8127	2682	3117	517	532	2544
GII/3(Syd53)	930	<100	<100	642	<100	<100
	1803	<100	<100	679	<100	<100
GIV/1(Syd3)	819	<100	<100	<100	729	<100
	806	<100	<100	<100	813	<100
GV/1(NK24)	1011	1996	199	336	151	2955
	6609	<100	<100	<100	<100	>3000
	4652	<100	<100	<100	<100	2824
	1052	<100	<100	<100	<100	2981
	563	<100	<100	<100	<100	2895
Anti-SV	1496	<100	<100	<100	<100	>3000
	155	<100	<100	<100	<100	>3000
PBS	8315	<100	<100	<100	<100	2584
		2229	1980	3101	2050	2490
		<100	<100	<100	<100	<100

数値はELISA法によるOD値 (x1000)