

2009 39015 A

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 21 年度 総括・研究分担報告書

研究代表者 野田 衛

平成 22 (2010) 年 3 月

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 21 年度 総括・研究分担報告書

研究代表者 野田 衛

平成 22 (2010) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告書

食品中のウイルスの制御に関する研究

野田 衛 ----- 3

II. 研究分担報告書

1. 2009年ノロウイルス感染状況とノロウイルス診断ICキット非反応株の対策

田中 智之 ----- 27

2. 平成20年度の愛知県におけるノロウイルスとサポウイルスの検出状況
およびノロウイルスの血清疫学調査

小林 慎一 他 ----- 39

3. パンソルビン・トラップ法による食品検査法の構築(検討1)

斎藤 博之 ----- 45

4. 豚でのE型肝炎ウイルス遺伝子型4の実験感染ならびに牛での本ウイルスの
浸潤調査

恒光 裕 ----- 61

5. ノロウイルスGII/4の新たな単系統群の発生とゲノム組換え体の同定

本村 和嗣 ----- 65

6. 2004年～2009年に国内で流行したノロウイルスGII/4のキャプシド蛋白質
分子モデル

横山 勝 ----- 71

7. E型肝炎ウイルス遺伝子型間の安定性の比較

李 天成 ----- 75

8. サポウイルス抗原検出法開発を目指したウイルス様中空粒子の作成

岡 智一郎 ----- 79

9. ノロウイルスと血液型抗原との結合に関する研究

白土 東子 ----- 87

III. 研究協力報告書

1. 研究協力者総括報告書

田中 智之 他 ----- 93

2. 北海道で発生した集団胃腸炎事例からのウイルス検出状況

吉澄 志磨 他 ----- 97

3. 2008/09シーズンのノロウイルス集団胃腸炎発生状況及び市販生食用カキの
ノロウイルス汚染実態調査

三上 稔之 他 ----- 113

4. 汚水処理施設におけるノロウイルス検出状況の比較検討

高橋 知子 他 ----- 131

5.	カキからのサポウイルス (SaV) の検出について	植木 洋 他 -----	139
6.	GII.4 ノロウイルスの新変異株 Apeldoorn317/2007/NL (AB445395) に近縁なノロウイルスによる胃腸炎の発生	田村 務 他 -----	143
7.	急性胃腸炎集団発生事例におけるノロウイルスの検出状況	篠崎 邦子 他 -----	153
8.	胃腸炎集団発生状況と調理従事者のノロウイルス排泄期間について	林志直 他 -----	163
9.	掃除機内ダストからのノロウイルスおよびサポウイルス汚染実態調査	吉田 徹也 他 -----	169
10.	平成 21 年度の富山県におけるノロウイルス・サポウイルスの検出状況	滝澤 剛則 他 -----	179
11.	パンソルビン・トラップ法による食品検査法の構築 (検討 2)	東方 美保 他 -----	187
12.	2008/09 シーズンに認められた GII.6 型ノロウイルスの遺伝子解析	入谷 展弘 他 -----	199
13.	環境と臨床検体からみた NV 流行の解析	内野 清子 他 -----	207
14.	二枚貝関連事例におけるウイルス検査の問題点	飯塚 節子 他 -----	215
15.	ノロウイルス遺伝子型 GII.4 の遺伝子学的変化と特徴	福田 伸治 他 -----	223
16.	急性胃腸炎の散発例及び集団発生例から検出されたノロウイルス、サポウイルスの遺伝子型	山下 育孝 他 -----	229
17.	熊本県におけるイノシシとシカの E 型肝炎ウイルス汚染実態調査	原田 誠也 他 -----	239
18.	感染性胃腸炎の集団発生例から検出されたノロウイルスの遺伝子解析	三浦 美穂 他 -----	251
19.	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	北元 憲利 他 -----	255
IV.	研究成果の刊行に関する一覧	-----	263

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 21 年度 総括研究報告書

研究代表者 野田 衛

平成 22 (2010) 年 3 月

平成 21 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」

総括研究報告書

食品中のウイルスの制御に関する研究

研究代表者 野田 衛 国立医薬品食品衛生研究所・食品衛生管理部
第四室長

研究要旨

ウイルス性食中毒の主要な原因となっている A 型肝炎ウイルス (HAV), E 型肝炎ウイルス (HEV), ノロウイルス (NoV) およびサポウイルス (SaV) について, 地方衛生研究所の協力の下, 検査法・検出法の確立, 伝播経路の解明, 食品や環境の汚染実態調査, 予防法の確立等を実施した。HEV の熱感受性に遺伝子型間に違いが認められ, G4 HEV は豚に感染性を有した。ウシは HEV の主要な宿主ではなく, イノシシの肝臓等から HEV 遺伝子を検出した。NoV に対する抗体保有調査では GII/4 が最も高い抗体保有率を示した。食品からのウイルス検出法としてパンソルビン・トラップ法を確立したが, 抗血清の安定した供給体制の確立が課題である。全国で検出された GII/4 199 株の全塩基配列を決定し, ウイルスの変化を解析した。NoV は Lewis 抗原においてもタイプ 1/2 間の違いを認識した。2008 年度は過去 2 シーズン同様 GII/4 が主流であったが, その検出割合は低下した。新たな GII/4 変異株 2008a や GII/6 の変異株を検出した。2008a は現行のイムノクロマト法に反応しないため, 同株の VLPs を発現し, モノクローナル抗体を作成した。複数の遺伝子型の NoV が関与する食中毒事例, NoV とアストロウイルスによるカキ関連食中毒事例を確認した。市販カキのパック水から NoV を検出した。NoV の除去率は合併浄化槽では安定しない傾向にあり, 下水放流水付近の垂下カキは糞便由来ウイルスのモニタリングに有用であった。下水流入水から新たな変異を含む多種の遺伝子型の NoV および SaV を検出した。同一由来ウイルスが 30 日以上掃除機のダストから継続して検出された。NoV 陽性となった調理従事者は陰性が確認されるまでに平均 3.4 回の検査, 平均 21.2 日が必要であった。食品からのウイルス検査には, DNase や PCR に用いる酵素の選択が重要である。SaV の VLPs の大量発現, 特異抗血清の作成を行い, 株間の抗原性の違いを明らかにした。供試した全ての SaV に反応するモノクローナル抗体等を得た。

研究分担者

田中 智之 堺市衛生研究所
小林 慎一 愛知県衛生研究所

齋藤 博之 秋田県健康環境センター
恒光 裕 動物衛生研究所
本村 和嗣 国立感染症研究所

横山 勝	同上	笠原ひとみ	同上
李 天成	同上	上田ひろみ	同上
岡 智一郎	同上	長瀬 博	同上
白土 東子	同上	藤田 暁	同上
		滝澤 剛則	富山県衛生研究所
研究協力者		中村 一哉	同上
内野 清子	堺市衛生研究所	小原 真弓	同上
三好 龍也	同上	岩井 雅恵	同上
吉田 永祥	同上	堀元 栄詞	同上
松尾 光子	同上	倉田 毅	同上
高橋 幸三	同上	東方 美保	福井県衛生環境研究センター
山下 照夫	愛知県衛生研究所		
皆川 洋子	同上	入谷 展弘	大阪市環境科学研究所
宮崎 綾子	動物衛生研究所	改田 厚	同上
山田 学	同上	阿部仁一郎	同上
服部奈千子	同上	久保 英彦	同上
吉澄 志磨	北海道立衛生研究所	飯塚 節子	島根県保健環境科学研究所
三好 正浩	同上		所
石田勢津子	同上	福田 伸治	広島県立総合技術研究所
三上 稔之	青森県環境保健センター		保健環境センター
吉田 綾子	同上	山下 育孝	愛媛県立衛生環境研究所
筒井 理華	同上	青木 紀子	同上
井上 治	同上	青木 里美	同上
高橋 知子	岩手県環境保健研究センター	原田 誠也	熊本県保健環境科学研究所
			所
齋藤 幸一	同上	西村 浩一	同上
植木 洋	宮城県環境保健センター	清田 直子	同上
田村 務	新潟県保健環境科学研究所	三浦 美穂	宮崎県衛生環境研究所
		北野 智一	同上
篠崎 邦子	千葉県衛生研究所	山本 正悟	同上
林 志直	東京都健康安全研究センター	北元 憲利	兵庫県立大学
		片山 和彦	国立感染症研究所
吉田 徹也	長野県環境保全研究所	佐藤 裕徳	同上
粕尾しず子	同上	劉 蘭軍	同上
畔上 由佳	同上	(順不同)	
内山友里恵	同上		

A. 研究目的

食品由来ウイルス感染症は国民の食生活にとって益々脅威となってきた。ノロウイルスによる集団食中毒、A型肝炎ウイルスによる集団急性肝炎、野生動物の生肉喫食によるE型肝炎ウイルス感染による劇症肝炎等、ウイルスに汚染された食品が原因となった疾病が的確に捉えられるようになり、事件数や患者数も正確に把握されるようになってきた。発生状況をつぶさに把握し、その結果を国民、行政機関および医療関係者に迅速かつ的確に提供することは、上記の感染症を制圧する上で重要な施策の一つである。これらの感染症の制御を困難にしている最大の理由は、現在ある検出法の検出限界を超えた、極めて微量のウイルス量で感染が成立することである。このため、二枚貝とノロウイルス、二枚貝とA型肝炎ウイルスの組合せ以外は原因食品や原因ウイルスを特定することが極めて困難な状況にある。食品由来ウイルス感染症においては、上記の三つのウイルスが緊急度、重要度の点で突出している。また、研究の進展とともに、サポウイルスが新たな脅威として登場してきた。いずれもRNAを遺伝子にもつウイルスであるが、これらを効率よく、かつ厳密に区別する必要もある。また、これらの感染症の制圧には、原因となった食品が汚染されるまでのウイルスの伝播経路を明らかにする必要がある。本研究では以下を研究目的とする。

(1) 原因食品からのウイルス検出では遺伝子増幅による定量法を確立するとともに、免疫学的手法を用いたウイルス濃

縮法を導入し、迅速性および検出効率の向上を目指す。

(2) 食品や環境からのウイルス検出を行うことによって汚染実態調査を行う。

(3) 個々のウイルスについてその発症ウイルス量を把握するため増殖、あるいは感染実験モデルを構築する。

(4) マーカー遺伝子を人工的に導入した組換え粒子を作製し、ウイルス不活化の条件を検討する。

(5) 以上の結果を総合的に解析し予防に必要な条件を整理し、予防法を確立する。

B. 研究方法

1. E型肝炎ウイルス

(1) E型肝炎ウイルス遺伝子型間の安定性の比較

遺伝子型3及び4のE型肝炎ウイルスを加熱処理(37℃~100℃, 1分間~1時間)、塩素処理(62.5ppm~1000ppm, 30分)、紫外線照射(50uw強度, 10, 20, 30, 60, 120分間)した後、PLC/PRF/5細胞に接種した。経時的に培養上清中のウイルス抗原をELISA法で測定し、E型肝炎ウイルスの増殖の有無により、ウイルスの熱安定性、消毒剤感受性、紫外線照射および有機溶媒に対する抵抗性などを検討した。

(2) E型肝炎ウイルスの豚感染実験

イノシシから検出され、サルでの実験感染で複製された遺伝子型4のE型肝炎ウイルスを、3日齢のノトバイオート豚2頭に静脈内接種し、ウイルス接種後5-7週間、臨床像を確認するとともに、糞便ならびに血清中のE型肝炎ウイルスRNA

量をリアルタイム PCR 法で、血清中の E 型肝炎ウイルス IgG 抗体を ELISA 法で測定した。

(3) イノシシ、シカおよびウシの E 型肝炎ウイルス抗体検査とウイルス遺伝子保有調査

養牛と養豚の両方を実施している 2 農場からウシ血清 91 例を採取し、ELISA 法による E 型肝炎ウイルス IgG 抗体検査ならびに nested RT-PCR 法による E 型肝炎ウイルス RNA 検査を行った。

イノシシ 118 頭 190 検体（筋肉：72，肝臓：86，血液：32）及びシカ 59 頭 125 検体（筋肉：40，肝臓：59，血液：26）について、E 型肝炎ウイルスの検出と遺伝子型別を実施し、検査法を検討した。

2. ノロウイルス・サポウイルス

(1) 食品等からのウイルス検出法の確立

昨年度までの研究で概ね確立したパンソルビン・トラップ法について、さらに改良を重ねるために、食品の超音波処理やアミラーゼ処理の検討、食品洗滌液の改良、反応時間の短縮（複合体形成時）、多くのノロウイルス遺伝子型に対応するために 19 種類の抗血清およびブロードバンド・モノクローナル抗体を用いての検討等を実施した。

(2) ノロウイルス診断用キットの改良

現行のイムノクロマト (IC) 法に反応しないノロウイルスについて、その検出感度等の精度向上を試みた。Baculovirus 発現系で VLPs を作製し、この VLPs を用

いて定法に従ってモノクローナル抗体の作製を試みた。

(3) ノロウイルスと血液型抗原との結合性の解析

GI の 5 遺伝子型 5 株、GII の 8 遺伝子型 11 株、計 13 遺伝子型 16 株のノロウイルス VLPs を用いて、4 種類の Monovalent 糖鎖との結合を Biacore で検出した。

(4) サポウイルス抗原検出法開発を目指したウイルス様中空粒子、抗血清、モノクローナル抗体の作成と解析

各種のサポウイルスの cDNA から COS7 細胞で組換えワクチニアウイルスを用いて、VLP を発現させた。細胞から精製した VLP を SDS-PAGE、電子顕微鏡観察等で VLP の存在及び形態を確認後、発現させた VLP を抗原として、ウサギ及びモルモットに免疫し、抗血清を得た。VLP 及び抗血清を用いて抗原性を分析した。また、各種の VLPs をマウスに免疫してモノクローナル抗体を作成し、ELISA 法、ウエスタンブロット法で反応性を検討した。

(5) ノロウイルスの抗体保有調査と流行ウイルスの把握

平成 18 年の 7 月～9 月に採血された愛知県民 200 名 (1～62 歳) の血清を対象に、GI/1 (Seto 株)、GI/4 (Chiba 株)、GII/3 (Sinsiro 株)、GII/4 (Narita104 株)、GII/10 (Hokushin 株)、GII/12 (Chitta 株)、GII/15 (Kamo 株) 計 7 株のウイルス様粒子 (VLPs) を抗原として ELISA プレートに固相化後、サンドイッチ型 ELISA 法で抗ノロウイルス抗体を測定し、吸光度 0.15 以

上を示した披検血清を陽性と判定した。一方、平成 20 年度に感染症発生動向調査協力医療機関で採取された感染性胃腸炎患者糞便 362 検体と嘔吐物 45 検体、胃腸炎集団発生 6 事例の患者 119 名の糞便検体を対象に、ノロウイルス、サポウイルスの検出と遺伝子型別を実施した。

(6) GII/4 流行株の全ゲノム分析及び構造解析

2006年5月15日から2009年2月17日の間に、20の道府県で採取されたノロウイルスGII/4 247株を対象に全塩基配列を決定を試みた。ゲノム配列の進化系統を近隣接合法、最尤法により推定した。ゲノム構造を、クローン化断片のbootscanning plots法、探索的系統分析法、情報部位分析法により解析した。

得られたGII/4の塩基配列情報を基に、ホモロジーモデリング法によりキャプシド蛋白質分子モデル構築した。GII/4 VA387 株のキャプシド蛋白質 P ドメイン構造を鋳型として2004/05, 2006a, 2006b, 2007a, 2008a の単量体モデル、さらにNorwalk virus キャプシド蛋白質多量体構造に重ね合わせることで二量体分子モデルを構築した。

(7) ノロウイルス、サポウイルスの流行ウイルスの把握、環境等からの検出、検査法の改良・開発

全国の18地衛研研究者の協力の下、ウイルス性食中毒の予防対策に向け、(1) 食中毒事例に関与するノロウイルス、サポウイルス、E型肝炎ウイルスの頻度、感染経路、ウイルス遺伝子学的特徴の把握、

(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の把握、(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ヒトの検体から迅速診断方法の精度向上などに関する調査・研究を実施した。

食中毒事例、集団発生、散発事例等の患者検体、カキ等の食品、下水等の環境水や室内ダストの環境材料を用いた。リアルタイムPCR法、nested RT-PCR法等によりウイルスを検出、定量後、増幅DNAの塩基配列を決定し、系統樹解析を行い、遺伝子型別の決定、相同性比較を実施した。

(倫理面への配慮)

本研究にあたっては、試料提供者、その家族の人権、尊厳、利益が保護されるよう十分に配慮した。具体的には、各研究実施機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、また提供試料、個人情報情報を厳格に管理、保存した。そのデータについて個人が特定されないよう配慮した。動物実験に関しては「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」(平成 18 年 6 月 1 日通知)及び「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン(日本学術会議)」(平成 18 年 6 月 1 日)の指針を踏まえつつ、動物実験が有効かつ適切に行われるよう配慮した。また感染研における「国立感染症研究所動物実験実施規程」(平成 19 年 1 月 1 日施行)に基づき、用

いる動物の数は最小限とし、採血時には麻酔を施し動物愛護の精神のもとに実験を行った。

C. 研究結果

1. E型肝炎ウイルス

(1) E型肝炎ウイルス遺伝子型間の安定性の比較

G3およびG4 E型肝炎ウイルスは紫外線照射、塩素処理で抵抗性に違いが認められなかったが、加熱処理に対しては両者に差が認められた(李 天成・研究分担報告書)。

(2) E型肝炎ウイルスの豚感染実験

E型肝炎ウイルス接種後7日から糞便ならびに血清中にE型肝炎ウイルスRNAが検出され、糞便中のE型肝炎ウイルスRNA量は解剖時まで高値を示した。血清中E型肝炎ウイルスIgG抗体は28-35日目から検出された(恒光 裕・研究分担報告書)。

(3) イノシシ、シカ、ウシのE型肝炎ウイルス抗体検査とウイルス遺伝子保有調査

供試ウシ血清91例のELISA抗体価(OD値)は一峰性分布を示した。OD値が0.2以上を示した血清15例中2例のみがE型肝炎ウイルス抗原による吸収操作でOD値が減少した。いずれの血清からもE型肝炎ウイルス遺伝子は検出されなかった(恒光・研究分担報告書)。

イノシシ118頭とシカ59頭についてE型肝炎ウイルスの汚染実態調査を行ったところ、シカはすべて陰性であったが、

イノシシは12頭(10.2%)からHEV遺伝子が検出された。遺伝子型別で地域特異的に6頭ずつG3とG4に分類された。遺伝子型別は制限酵素 *Hha* Iによる切断パターンでも簡易的に実施できた(原田誠也・研究協力報告書)。

2. ノロウイルス・サポウイルス

(1) 食品等からのウイルス検出法の確立

食品の超音波処理はノロウイルスを洗い出す操作に一定の基準を設けることができ、特に油を多く含む食品に対して有効であった。 α -Amylaseによる前処理でRNA抽出液の凍結保存中に炭水化物の沈澱が生じるという問題を解決できた。食品洗滌液を改良することで、パンソルビンの結合性が向上し、プール血清やブロードバンド・モノクローナル抗体の使用が可能となった。前者についてはGII/4以外の血清型でも検出可能であることを確認した。後者については抗体添加量を増やすことで実用可能であることが示された(斎藤博之・研究分担報告書)。

複合体形成のための反応時間を、抗血清添加30分、パンソルビン添加30分の反応から抗血清とパンソルビンを同時添加15分に短縮化できた。16種類の遺伝子型のノロウイルス陽性糞便のうち、それぞれ対応する抗血清を単味で用いた場合、同量ずつ混合したプール血清の場合(GIプール血清(6種プール)16種類、GIIプール血清(13種プール)、ノロウイルスプール血清(19種プール)、モノクローナル抗体の場合(GII特異的抗体4種類)でいずれも濃縮効果が確認できた(東方美保・研究

協力報告書)。

(2) ノロウイルス診断用キットの改良

現行のイムノクロマト法とRT-PCR法との比較では、一致率 89.3%、感度 81.6%、特異性 89.3%であった。この成績はノロウイルス感染症や食中毒の初期対応には耐えられる成績である。しかし、GII/4の新たな亜型である 2008a(本村和嗣・研究分担報告書、田村 務・研究協力報告書)はイムノクロマト法に反応しなかった。これに対応するため、この株を用いてBaculovirusで発現したVLPsを作成し、モノクローナル抗体の作製を試みた。現在 5 クローンが得られ、腹水による抗体を大量に作製中である(田中智之・研究分担報告書)。

(3) ノロウイルスと血液型抗原との結合性の解析

供試 16 株中 5 株 (5 遺伝子型) で VLP と糖鎖との結合を検出した。5 株いずれも Lewis-b または Lewis-y 抗原に結合し、その結合速度はタイプ 1 構造 (Lewis-b) よりタイプ 2 構造 (Lewis-y) が高く、ABO 抗原の結果と一致した。Lewis-a または Lewis-x 抗原には 2 株が結合し、そのうちの 1 株の結合速度はタイプ 1 構造 (Lewis-a) よりタイプ 2 構造 (Lewis-x) で高く、ABO 抗原および Lewis-b/y 抗原の結果と一致したが、他の 1 株はこれまでの結果と一致しなかった(白土東子・研究分担報告書)。

(4) サポウイルス抗原検出法開発を目指したウイルス様中空粒子、抗血清、モノ

クローナル抗体の作成と解析

COS7 細胞を用いてサポウイルス GII/2 Mc10 株および GII/3 C12 株の VLPs の大量発現に成功した。精製した VLP の直径は約 40-45nm であった。発現実験を複数回行うことで、これらの VLPs に対するウサギおよびモルモットでの特異抗血清の作製、抗体力値の測定、抗原 ELISA を用いた抗原性の評価を行うことが出来た。抗原 ELISA の結果、GII/2 Mc10 VLPs と GII/3 C12 VLPs の抗原性が異なることが示された(岡 智一郎・研究分担報告書)。

GI/1-、GI/5-、GII/3-、GIV/1-、GV/1-VLPs を抗原とした ELISA 法およびウエスタンブロット法により各モノクローナル抗体の反応性を調べたところ、株特異的、遺伝子群特異的に反応する抗体、すべての遺伝子群に交叉する抗体があることがわかった(北元憲利・研究協力報告書)。

(5) ノロウイルスに対する抗体保有調査と流行ウイルス

ノロウイルス 7 株に対する県民全体の抗体保有率は、Seto 株(G1):23.5%、Chiba 株(G4):30.0%、GII の Sinsiro 株(G3):39.5%、Narita104 株(G4):62.5%、Hokushin 株(G10):33.0%、Chitta 株(G12):39.0%、Kamo 株(G15):38.0%であった。各年齢階層で GII.4 (Narita104) に対する保有率が最も高い傾向が認められた。

一方、2008 年度にノロウイルスは GI.7、GII.3、GII.4、GII.16、GII.12、GII.13 が、サポウイルスは GI のみが検出され、昨シーズン高頻度に検出された GIV は検

出されなかった（小林慎一・研究分担報告書）。

(6) GII/4 流行株の全ゲノム分析及び構造解析

GII/4 247 株中計 199 株の全塩基配列を決定した。それらは、7つの単系統群に分かれ、199 株中 177 株約 89%は、2006b 亜株であった。7種の GII/4 単系統群亜株を同定し、その 5種はゲノム組換えで発生した可能性が示唆された。2006/07 秋冬期以来、世界的流行株 2006b は、常に優勢なサブタイプとして全国各地で検出され、2007/08 には 2007a 亜株、2007b 亜株の存在が確認されたが局地的流行に留まった。EU-2006b は複製タンパク質と capsid タンパク質に計 26 箇所の特異的変異をもち、それらの変異を保ちつつ現在も国内の感染の主因となっていた（本村和嗣・研究分担報告書）。

さらに、世界的流行株 2006b に見られた特徴的な残基の変異は、7か所のうち 6か所はキャプシド蛋白質二量体の外側表面に位置し、1つは側面に位置した。2004/05、2006a、2007a、2008a では、それぞれ 7つ、2つ、4つ、5つがキャプシド蛋白質 P ドメイン二量体の外側表面に位置していた（横山 勝・研究分担報告書）。

(7) ノロウイルス、サポウイルスの検出状況と遺伝子学的特徴

今年度のノロウイルス流行は前シーズンに比べ減少したが、集団発生の健康危機事例の報告は多く、不顕性感染調理従事者を介する事例が依然認められる（吉

澄志磨、林 志直、篠崎邦子、滝澤剛則、山下育孝・各研究協力報告書）。主要検出遺伝子型は GII/6、GII/4、GII/3、GI/4 で、複数の遺伝子型の混合/重感染（山下育孝、林 志直・各研究協力報告書、田中智之・研究分担報告書）、同一クラスターを形成したカキ由来 2 事例（三浦美穂・研究協力報告書）、中国産冷凍カキフライを原因食品とするノロウイルス/アストロウイルス混合感染事例（吉澄志磨・研究協力報告書）等が確認された。

ノロウイルスに感染した調理従事者の糞便中のウイルスが陰性化するには平均 21.2 日を要した（林 志直・研究協力報告書）。

(8) 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

下水等の環境検体から検出される遺伝子群は多様であり、ノロウイルスのみならずサポウイルスも検出された（滝澤剛則・研究協力報告書）。下水処理によるノロウイルス除去に関し、下水道、漁場集落排水では安定した除去率を示したが、合併浄化槽は安定せず且つ低い除去率を示した（高橋知子・研究協力報告書）。市販生食用カキのパック水から GI/4、GII/4、GII/6 の遺伝子が検出され（三上稔之・研究協力報告書）、カキの垂下実験から GIV/1 クラスターに分類されるサポウイルスが検出されている（植木 洋・研究協力報告書）。

掃除機のダストからノロウイルス $10^{5.7}$ コピー/g、サポウイルス $10^{6.6}$ コピー/g 検出され、それぞれ 30 日間、105 日間継続して検出された（吉田徹也・研究協力報告

書)。

(9) 食中毒事例，環境由来ウイルス遺伝子の分子疫学的解析

近年の主流行ノロウイルス遺伝子型は GII/4 であり，2009/10 シーズンも同様であった。GII/4 流行株の P2 ドメインのアミノ酸変異の詳細な分析(福田伸治・研究協力報告書)を行った。GII/6 の新しいクラスタを形成する株の流行(入谷展弘・研究協力報告書)を確認し，組替え体ウイルス(滝澤剛則・研究協力報告書)や新たなクラスターを形成する GII/4 亜型(2008a)を検出した(田村 務・研究協力報告書)。GII/4 ノロウイルスは他の遺伝子型に比べ，排泄されるウイルス量が多い傾向を認めた(福田伸治・研究協力報告書)。

(10) 食材からウイルスの検出方法の改良とヒト検体から迅速診断方法の精度向上

二枚貝関連食中毒事例において，二枚貝からのウイルス検出率に DNase 処理が影響するため，検査法の改良を行った。また，PCR で増幅した DNA のシーケンスを行う場合，PCR に使用する耐熱性 DNA ポリメラーゼの種類により得られる塩基配列に影響を及ぼす場合があった(飯塚節子・研究協力報告書)。サポウイルスに対するモノクローナル抗体を作製し，その反応性を評価した(北元憲利・研究協力報告書)。またそれを応用した迅速・簡便な診断キットを構築し，精度の向上を計った(田中 智之・研究分担報告書)。

D. 考察

1. E 型肝炎ウイルス

(1) E 型肝炎ウイルス遺伝子型間の安定性の比較

E 型肝炎ウイルスには少なくとも四つの遺伝子型が存在し，遺伝子型によってウイルスの安定性が異なることから不活化条件を検討するときに遺伝子型を考慮する必要がある。

(2) E 型肝炎ウイルスの豚感染実験

イノシシ由来遺伝子型 4 の E 型肝炎ウイルスは豚で感染性を有することが明らかになった。今回の供試験株は国立感染症研究所においてサルでの感染性が確認され，実験感染サルの糞便を接種材料としたことから，本ウイルス株はイノシシ-サル-豚間で感染が容易に成立することが推測され，これら動物とヒト間での感染も起こり得ると考えられた。

(3) イノシシ，シカ，ウシの E 型肝炎ウイルス抗体検査とウイルス遺伝子保有調査

ウシでの E 型肝炎ウイルス感染を調査した結果，ELISA で抗体陽性の多くは非特異反応であると考えられ，また，いずれの血清材料からも E 型肝炎ウイルス RNA は検出されなかった。これらのことから，ウシは主要な E 型肝炎ウイルス保有宿主ではなく，ウシ由来畜産物の E 型肝炎ウイルス汚染リスクは無いあるいは極めて低いと推測された。

今回，イノシシの肝臓等から E 型肝炎ウイルスを検出したが，ブタからも E 型肝炎ウイルス遺伝子が確認されていることから，今後，これらの動物の E 型肝炎

ウイルス調査を継続する必要がある。

2. ノロウイルス、サポウイルス

(1) 食品等からのウイルス検出法の確立

今年度は最終年度として、利便性向上に加えて GII/4 以外の血清型への対応を視野に入れ、それに必要なプロトコル改良を行い、検査法を概ね確立することができた。今後はこれらの抗体の生産・安定供給体制の確立が新たな課題となった。

(2) ノロウイルス診断用キットの改良

現行のイムノクロマト法はノロウイルス感染症や食中毒の患者からの検出法として有用性が認められている。しかし、今回新たに検出された 2008a 類似株は、イムノクロマト法に反応しない株であった。変異が大きいノロウイルスにおいては、今後も同様の変異株の出現が予想され、継続した動向監視と変異株に対する対応を続ける必要がある。

(3) ノロウイルスと血液型抗原との結合性の解析

ノロウイルスは Lewis 抗原においてもタイプ 1/2 間の違いを認識していることが明らかとなった。ノロウイルスは遺伝学的、血清学的に多様であるため、ELISA などによる検出が困難であるが、血液型抗原への結合においては高い特異性と保存性を有し、これを利用した検出系の開発が期待できる。

(4) サポウイルス抗原検出法開発を目指したウイルス様中空粒子、モノクロー

ナル抗体の作成と解析

サポウイルスもノロウイルスと同様、異なる genotype に属する株間では抗原性が異なることが裏付けられた。急性胃腸炎患者の糞便からは、新たな genotype と思われるサポウイルス株が見つかってきているため、高精度なサポウイルス抗原検出系を確立するためには、現在までに作成された抗 VLPs 抗体に加え、さらに異なる genotype に属する株を網羅した抗原パネルの作製と、これらに対する特異抗体、あるいは共通エピトープを認識するモノクローナル抗体セットの確立が求められる。

(5) ノロウイルスに対する抗体保有調査と流行ウイルスの把握

ノロウイルス抗体の感染防御における役割は不明であるが、GII/4 株に対しての抗体保有率が高いことは、近年の GII/4 株の流行の反映と考えられた。2008 年度は過去 2 シーズン同様 GII/4 が主流であったが、その検出割合は低下した。今後とも、抗ノロウイルス抗体保有率の推移と実際に流行したノロウイルスの遺伝子型との相関関係を継続調査することが必要である。

(6) GII/4 流行株の全ゲノム分析及び構造解析

本研究により、世界で初めて、世界的な大流行の原因となった GII/4 EU-2006b 株の全ゲノム配列が明らかになった。この情報をもとに、キャプシド領域および他の領域に過去の流行株では観察されない特徴的変化が明らかになった。GII/4

EU-2006b 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。このことから、ゲノム情報の総合的な変化により、免疫逃避能力と高い感染・増殖能力をバランスよく獲得したウイルスが世界に広がると推察している。また、効率的に抗原性と感染・増殖能を変化させ、ヒト集団で感染を持続する能力を維持している可能性が示唆される。

カプシッド蛋白質上の特徴的な残基の変化は世界的な大流行した 2006b や 2004/05 において最も多い。このことは、外側表面に位置する特徴的な残基が、抗原性や感染受容体との結合様式を調節している可能性を示唆する。特に、2006b と 2004/05 に共通に見られた 2 か所の変異は抗原性や感染受容体との結合様式の制御に中心的な役割を果たしていることが考えられた。

(7) ノロウイルス、サポウイルスの検出状況と遺伝子学的特徴

ノロウイルスは依然 GII/4 が主流であるが、2008a 等の新たな GII/4 変異株の出現に加え、GII/6 変異株、組換え型ウイルスなども検出され、今後もノロウイルス全般の継続した動向監視が必要である。

ノロウイルス遺伝子型 GII.4 の変異は 2～3 年毎に出現し、有意な変化はウイルス粒子の最も外側に位置する P2 ドメインに集中していることが確認された。

(8) 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

下水流入水から検出されるノロウイルスの遺伝子型には流域差が認められた。

下水流入水は、主に不顕性感染により地域に浸淫しているノロウイルスやサポウイルスを反映しているものと考えられた。

調査した污水处理施設において、冬季には放流水にノロウイルスの排出がみられたことから、カキ等二枚貝のノロウイルス汚染の低減化には、污水处理施設の対策が課題と考えられた。

調理従事者のノロウイルス陰性確認試験の結果、陰性化まで事件発生後 21.2 日を要した。これは一般的な営業自粛等の処分期間より長く、食品健康危害拡大を防止するために、調理従事者の病原因子陰性確認の重要性が改めて確認された。

遺伝子解析によって同一由来ウイルスが 30 日以上の間、ダストから継続して検出されることが示されたから、ダストは重要な感染源になりうるということが強く示唆された。塩素剤を用いることができない掃除機等の電化製品の消毒には、消毒用アルコールもある程度有効と思われた。

(9) 食中毒事例、環境由来ウイルス遺伝子の分子疫学的解析

カキ関連食中毒事例において、ノロウイルスとアストロウイルスの混合感染が確認されたことから、今後、二枚貝の喫食のない食中毒や感染症事例も含め、集団胃腸炎事例におけるノロウイルス以外の胃腸炎ウイルスの関与について、調査を進める必要がある。パック水からノロウイルス遺伝子を検出したことから、開封時の飛散などにより感染源になる可能性があり、その取扱いに注意が必要と考えられた。

カキから検出されたサポウイルス遺伝子を分子疫学的に解析した結果、ヒト由来株と 100%の相同性が確認されたことから、サポウイルスのカキ汚染もノロウイルスと同様にヒト～環境水～カキであることが示唆された。

カキ関連食中毒 2 事例のノロウイルス遺伝子解析結果から、同じ海域のカキが原因であると考えられた。各地の生産地でカキから検出されたノロウイルス遺伝子解析のデータとの比較が可能であれば、より詳細な検討ができると考えられた。

(10) 食材からウイルスの検出方法の改良とヒト検体から迅速診断方法の精度向上

同一検体の PCR 増幅産物をクローニングし塩基配列を決定した場合、酵素間で配列が一致しない場合があるので、酵素の特性を加味して結果を解釈する必要がある。また、食品等ウイルス量の少ない検体から RNA ウイルスを検出する場合、DNase 処理操作によって検出率が低下する場合があるが、用いる Nase 試薬によっては、RNA 定量値、ウイルス検出率が DNase 未処理と同等のものもあるので、その選択が重要である。

E. 結論

- E 型肝炎ウイルスの熱感受性に遺伝子型間に違いが認められた。
- 遺伝子型 4 の E 型肝炎ウイルスは豚で感染性を有する。
- ウシ血清から E 型肝炎ウイルス RNA は検出されず、E 型肝炎ウイルス抗体も多くは陰性であった。
- イノシシの肝臓等の約 10%から HEV を検出した。
- 7 種類のノロウイルスに対する抗体保有調査の結果 GII.4 が最も高い抗体保有率を示した。
- 食品からのウイルス検出法としてパンソルビン・トラップ法を確立した。抗血清の安定した供給体制の確立が課題である。
- 2006 年 5 月 15 日から 2009 年 2 月 3 日に全国で検出された GII/4 199 株の全塩基配列を決定した。それらは、7 つの単系統群に分かれ、EU-2006b 亜株が主流であった。7 種の単系統群のうち 5 種はゲノム組換えで発生した可能性が示唆された。
- カプシッド蛋白質上の特徴的な残基の変化は世界的大流行した 2006b や 2004/05 において多く認められた。
- ノロウイルスは Lewis 抗原においてもタイプ 1/2 間の違いを認識していることを明らかにした。血液型抗原との結合を利用した検出系の開発が期待できる。
- GII の異なる genotype に属するサポウイルス 2 株の哺乳動物培養細胞を用いた VLPs の大量発現、特異抗血清の作成を行い、抗原性が異なることを明らかにした。
- サポウイルスに対する株特異的、遺伝子群特異的および全てに反応するモノクローナル抗体を得た。
- 2008 年度は過去 2 シーズン同様 GII/4 が主流であったが、その検出割合は低下した。新たな GII/4 変異株 2008a を検出し、GII/6 変異株の流行

を確認した。2009 年度は流行開始が遅く、年明けに流行が開始した。

- GII/4 亜型 2008a は現行のイムノクロマト法に反応しないため、同株の VLPs を発現し、モノクローナル抗体を作成した。
- ノロウイルスは Lewis 抗原においてタイプ 1, 2 構造を識別する。
- 複数の遺伝子型のノロウイルスが関与する食中毒事例、ノロウイルスとアストロウイルスによるカキ関連食中毒事例を確認した。
- 市販カキのパック水からノロウイルスを検出した。
- ノロウイルスの除去率は合併浄化槽では低く、安定しない傾向にあった。
- 下水放流水付近の垂下カキは糞便由来ウイルスのモニタリングに有用であった。
- 下水流入水から新たな変異を含む多種の遺伝子型のノロウイルスおよびサポウイルスを検出した。
- PCR 増幅産物をクローニングし塩基配列を決定した場合、用いる PCR 酵素に影響を受ける場合がある
- 食品等ウイルス量の少ない検体から RNA ウイルスを検出する場合、DNase 処理操作に注意が必要である。
- 同一由来ウイルスが 30 日以上の間、掃除機のダストから継続して検出された。
- ノロウイルス陽性となった調理従事者は陰性が確認されるまで平均 3.4 回の検査、平均 21.2 日が必要であった。

F. 健康危害情報
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Shinkawa N., Noda M., Yoshizumi S., Tokutake Y., Shiraishi T., Arita-Nishida T., Nishio O., Oka T., Hansman GS., Takeda N., Kimura H.
Molecular epidemiology of noroviruses detected in food handler-associated outbreaks of gastroenteritis in Japan. *Intervirology*. 2008; 51(6):422-426. Epub 2009 Mar 4.

Yasutaka Yamashita, Yuka Ootsuka, Reiko Kondo, Mitsuaki Oseto, Mitsunori Doi, Takeshi Miyamoto, Tetsuroo Ueda, Hirokazu Kondo, Tomoyuki Tanaka, Takaji Wakita, Kazuhiko Katayama, Naokazu Takeda and Yomoichiro Oka.
Molecular characterization of Sapovirus detected in a gastroenteritis as a wedding hall. (*J. Med. Virol.* in press)

Kobayashi S., Fujiwara N., Takeda N. and Minagawa H. Seroepidemiological study of norovirus infection in Aichi Prefecture, Japan. *Microbiol. Immunol.* 53: 356-359, 2009

Motomura K. "Analysis of genetic recombination between human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and HIV-2" *Jpn. J. Infectious Disease.*

2009 Mar;83(2):81-93.

Sahbandar IN, Takahashi K, Djoerban Z, Firmansyah I, Naganawa S, Motomura K, Sato H, Kitamura K, Pohan HT, Sato S.

"Current HIV type 1 molecular epidemiology profile and identification of unique recombinant forms in Jakarta, Indonesia. " AIDS Res Hum Retroviruses. 2009 Jul;25(7):637-46.

Yamashita T, Mori Y, Miyazaki N, Cheng RH, Yoshimura M, Unno H, Shima R, Moriishi K, Tsukihara T, Li TC, Takeda N, Miyamura T, Matsuura Y. Biological and immunological characteristics of hepatitis E virus-like particles based on the crystal structure. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Aug 4;106(31):12986-91.

Sugitani M, Tamura A, Shimizu YK, Sheikh A, Kinukawa N, Shimizu K, Moriyama M, Komiyama K, Li TC, Takeda N, Arakawa Y, Suzuki K, Ishaque SM, Roy PK, Raihan A, Hasan M. Detection of hepatitis E virus RNA and genotype in Bangladesh. J Gastroenterol Hepatol. 2009 Apr;24(4):599-604.

Sugitani M, Sheikh A, Suzuki K, Kinukawa N, Moriyama M, Arakawa Y, Komiyama K, Li TC, Takeda N, Ishaque SM, Roy PK, Raihan AS, Hasan M. Sero-epidemiology of sporadic acute

hepatitis in Bangladesh: high prevalences of infection with type-B, type-E and multiple types of hepatitis virus. Ann Trop Med Parasitol. 2009 Jun;103(4):343-50.

Kitajima M., Oka T., Haramoto E., Katayama H., Takeda N., Katayama K., Ohgaki S. Detection and genetic analysis of human sapoviruses in river water in Japan Applied and Environmental Microbiology. In press

Oka T., Yokoyama M., Katayama K., Tsunemitsu H., Yamamoto M., Miyashita K., Ogawa S., Motomura K., Mori H., Nakamura H., Wakita T., Takeda N., Sato H. Structural and biological constraints on diversity of regions immediately upstream of cleavage sites in calicivirus precursor proteins. Virology. 2009; 394(1):119-129.

Kitajima M., Oka T., Tohya Y., Katayama H., Takeda N., Katayama K. Development of a broadly reactive nested reverse transcription-PCR assay to detect murine noroviruses, and investigation of the prevalence of murine noroviruses in laboratory mice in Japan. Microbiology and Immunology. 2009; 53(9):531-534.

Oka T., Miyashita K., Katayama K., Wakita T., Takeda N. Distinct genotype and antigenicity among

- genogroup II sapoviruses. *Microbiology and Immunology*. 2009 53(7):417-420.
- Ootsuka Y., Yamashita Y., Ichikawa T., Kondo R., Oseto M., Katayama K., Takeda N., Oka T. Molecular characterization of sapoviruses detected in sporadic gastroenteritis cases in 2007 in Ehime Prefecture, Japan. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 2009; 62(3):246-248.
- Tetsuya Yoshida, Shizuko Kasuo, Yuka Azegami, Yurie Uchiyama, Kazuyo Satsumabayashi, Takashi Shiraishi, Kazuhiko Katayama, Takaji Wakita, Naokazu Takeda, and Tomoichiro Oka: Characterization of sapoviruses detected in gastroenteritis outbreaks and identification of asymptomatic adults with high viral load. *J. Clin. Virol.*, 45: 67-71, 2009.
- Iwai M, Hasegawa S, Obara M, Nakamura K, Horimoto E, Takizawa T, Kurata T, Sogen S, Shiraki K.: Continuous existence of noroviruses and sapoviruses in raw sewage reveals infection among inhabitants in Toyama, Japan (2006-2008). *Appl. Environ. Microbiol.*, 75, 1264~1270, 2009.
- Nakamura K, Iwai M, Zhang J, Obara M, Horimoto E, Hasegawa S, Kurata T, and Takizawa T. Detection of a novel recombinant norovirus from sewage water in Toyama prefecture, Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 62, 394-398, 2009.
- Nakamura K, Saga Y, Iwai M, Obara M, Horimoto E, Hasegawa S, Kurata T, Okumura H, Nagoshi M and Takizawa T. Frequent Detection of Noroviruses and Sapoviruses in Swine Population and High Genetic Diversity of Porcine Sapovirus in Japan, during fiscal year 2008. *J. Clinic. Microbiol.*, in press.
- J Siebenga, H Vennema, DP Zheng, J Vinj, B Lee, XL Pang, E Ho, W Lim, A Choudekar, S Broor, T Helperin, N Rasool, J Hewitt, G Greening, M Jin, ZJ Duan, Y Lucero, M O' Ryan, M Hoehne, E Schreier, RM Ratcliff, P White, N Iritani, G Reuter, M Koopmans: Norovirus illness is a global problem: Emergence and spread of norovirus GII.4 variants, 2001-2007, *J Infect Dis* 200, 802-812, 2009
- Setsuko Iizuka, Tomoichiro Oka, Kenji Tabara, Tamaki Omura, Kazuhiko Katayama, Naokazu Takeda and Mamoru Noda : Detection of sapoviruses and noroviruses in an outbreak of gastroenteritis linked genetically to shellfish. (*J. Med. Virol.* in press.)
- Fukuda S., Takao S., Shigemoto N., Tanizawa Y., Seno M.: Transition of genotypes associated with norovirus gastroenteritis outbreaks in a limited