

は、プール血清使用時の方が高くなるケースもあった(GII/1の場合;図7)。

さらに、表2の検討で回収効果が十分確認できなかった遺伝子型(GII/3, 6, 8, 12, GI/2)について、別の糞便検体を用いるなどの再検討を行った。その際、抗血清を用いた場合に加え、モノクローナル抗体を用いた場合、抗体を全く加えない場合についても比較した。

その結果は表3のとおりで、3種類の遺伝子型(GI/2, GII/3, 12)については、汚染レベルを高くしたところ、単味血清、遺伝子群別プール血清、NV プール血清の場合で回収が可能であった。残る2種類の遺伝子型(GII/6, 8)も、別の患者由来の糞便検体を用いることで、単味血清、遺伝子群別プール血清、NV プール血清の場合で回収可能であることが確認できた。

なお、モノクローナル抗体を用いた場合には、GII specific とされる MAb#14 を単独で用いた場合で4種類の遺伝子型(GII/3, 6, 8, 12)、broad な MAb#22 と MAb#23 を等量混合したカクテル抗体を用いた場合で2種類の遺伝子型(GII/3, 6)について濃縮効果が認められた。モノクローナル抗体による濃縮効果が確認できた、GII/12, 6型の増幅曲線を図8, 9に示す。いずれの場合も高い汚染レベルの場合にのみ検出され、回収効率も抗血清使用時よりかなり低かった。また、今回の反応条件では、GI 検出系においてモノクローナル抗体を用いた場合の濃縮効果を確認することはできなかった。

D. 考察

ウイルスが含まれる食品洗滌液の遠心

上清に、抗体とパンソルビンを添加した際のウイルス-抗体-パンソルビン複合体形成は、イムノクロマト法による検出過程でも見られるとおり短時間で十分と予想された。また、抗体分子において抗原を認識する部位と ProteinA が吸着する部位は異なっているため、双方が競合することなしに同時反応が可能なものとして判断した。図3, 4によれば、反応時間0分の場合、すなわち37°Cで反応させなくても、ある程度の回収が確認できた。この場合、複合体形成反応は試薬添加や遠心操作時に伴うロスタイムおよび遠心時間20分間の間に進行しているものと考えられる。なお、37°Cでのインキュベーションは、ウイルス-抗体-パンソルビン複合体形成だけでなく、 α -Amylase による前処理(詳細は研究分担報告書: 斎藤・秋田を参照)も兼ねている。炭水化物が多く含まれるポテトサラダで、反応時間短縮による定量値低下がより顕著だったことを考慮すると、複合体形成の進行度よりも、 α -Amylase による炭水化物消化効果の及ぼす影響がむしろ大きいのかもかもしれない。

多種類の遺伝子型への適用を検討した表2において、×や△が含まれており再検討の対象としたのは、GI/2, GII/3, 6, 8, 12の5種類の遺伝子型であった。これらの遺伝子型のケースについて、回収率に影響を与える因子として想定される、汚染レベル、抗血清の力価、汚染ウイルス-抗体結合の特異性について考察を加えた。

まず、汚染に用いた糞便上清の濃度は、GI/2, GII/6, 8, 12が $10^1 \sim 10^2$ オーダー(copies/反応)と低かった。汚染レベルが

高目だと検出できるようになるため、影響の大きい因子と考えられる。

また、対応する抗血清の力価は、GⅡ/3, 8, 12 の 3 種類の遺伝子型が約 100~200 万倍、GⅡ/6 は約 400 万倍であった。19 種類全体では、約 100 万倍~3,000 万倍以上の範囲であり、回収効率が低かった遺伝子型はいずれも力価が低めであったため、抗体不足の可能性もある。

さらに、各抗血清の免疫抗原とした VLP の配列由来ウイルス株についてのデータを参照すると、採取年や採取場所において今回使用した汚染ウイルス株とかなりの隔たりがあるなど、抗原性が異なる可能性が高い場合もあった。例えば、抗 GⅡ/8 血清の免疫抗原株はタイ由来である。また、抗 GⅡ/6 血清の免疫抗原株は 2000 年の日本由来であるが、今回使用した汚染ウイルス株 22103T5 は 2009 年 4 月の流行株で、遺伝子配列解析により過去の流行ウイルスと別のクラスターに分類される可能性もある。

単味血清、プール血清、モノクローナル抗体をそれぞれ使用した場合での回収効率の違いについては、研究分担報告書：斎藤・秋田に詳細な考察がある。そちらに倣い、リアルタイム PCR 法での Ct 値で比較すると、単味血清と遺伝子群別プール血清での差は~2.8 サイクル、単味血清と NV プール血清での差は~4.5 サイクル、単味血清と遺伝子群特異的モノクローナル抗体での差は~4.8 サイクル、単味血清と broad なモノクローナル抗体カクテルでの差は~8.2 サイクルという状況であった。

このデータをふまえ、実際に食中毒疑い

事例が発生し推定原因食品からのウイルス濃縮を試みる場面を想定してみた。回収効率に優れる単味血清を使用するためには、喫食者糞便に含まれる原因 NV の遺伝子型を特定する必要があり初動が遅れることになる。逆に、すぐに食品検査に取りかかることが可能な 19 種の NV プール血清の使用では、回収効率の大幅な低下が避けられない。したがって、喫食者糞便のリアルタイム PCR 検査で得られる遺伝子群別検出結果を参考に、遺伝子群別プール血清を利用するのが、現時点で最もバランスがとれた選択肢と考えられた。

E. 結論

パンソルビン・トラップ法のプロトコール改良の一環として、複合体形成のための反応部分について、抗血清とパンソルビンを同時添加して 15 分間反応させる形に簡略化可能であることを確認した。

さらに、汚染モデル食品からのパンソルビン・トラップ法による回収効果を、16 種類の遺伝子型 (GI/1, 2, 3, 4, 8, 11, GⅡ/1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12) の NV について検証した。対応する単味血清、遺伝子群別のプール血清、NV プール血清を用いた場合のいずれでも検出可能であることが確認できた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 東方美保、川畑 光政、斎藤 博之、田

中 智之、武田 直和：パンソルビン・トラップ法による食品検体からのノロウイルスの回収検討(第1報), 福井県衛生環境研究センター年報, 7, 69-72(2009)

2. 学会発表

- 1) 東方美保、斎藤博之、白土東子、田中智之、野田衛：パンソルビン・トラップ法により汚染食品から濃縮回収したノロウイルスの遺伝子検出条件の検討、第57回日本ウイルス学会学術集会、東京都、2009年10月、

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

表 1 複合体形成処理の条件設定

	抗血清	+パンソルビン	同時添加
ア	30分	+30分	
イ	30分	+15分	
ウ	15分	+30分	
エ	15分	+15分	
オ			30分
カ			15分
キ			10分
ク			5分
ケ			0分

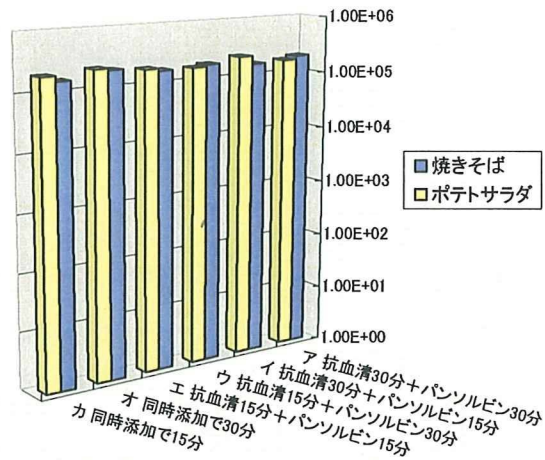


図 1 複合体形成処理条件の検討
(焼きそば、ポテトサラダの場合)

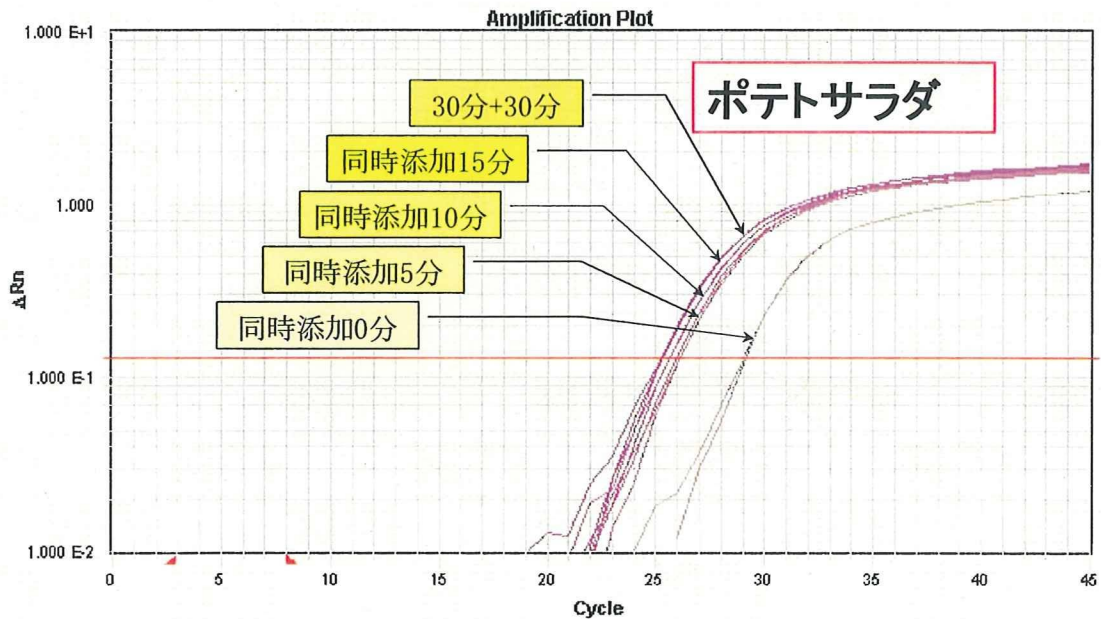


図 2 複合体形成処理条件の検討 (ポテトサラダの場合の増幅曲線)

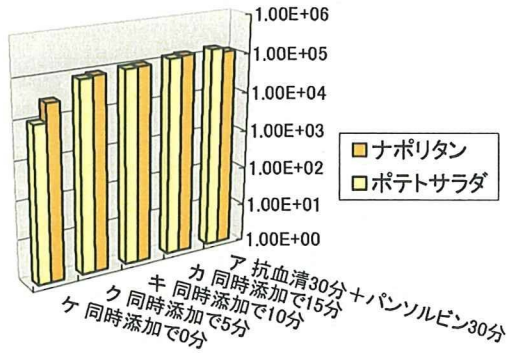


図3 複合体形成処理条件の検討
(ナポリタン、ポテトサラダの場合)

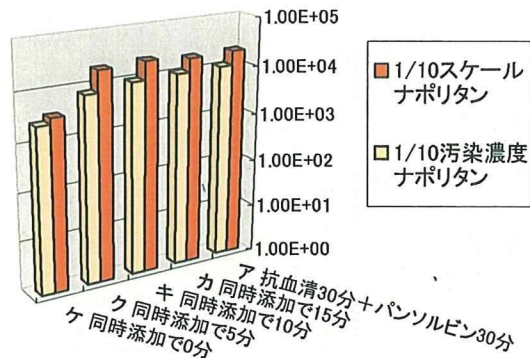


図4 複合体形成処理条件の検討
(ナポリタンで1/10スケール、
1/10汚染濃度の場合)

表2 各遺伝子型のNVにおける検討(抗血清使用)

G I 検出系	汚染用糞便	上清のみ定量値	単味血清	G I プール血清	NVプール血清	備考
遺伝子型	使用検体番号	採取年月	(copies/反応)	(対応する1種)	(6種プール)	(19種プール)
GI/1	21508T47	2004.3	3.5E+02	○	○	○
GI/2	21608T4	2004.12	3.0E+01	△	△	△
GI/3	21618F17	2005.2	2.7E+02	○	○	○
GI/4	22017N23	2009.3	4.3E+02	○	○	○
GI/8・GI/?	21620W3 ¹⁾	2005.3	9.8E+01	○	○	○ ³⁾
GI/11	21616T12	2005.1	8.3E+02	○	○	○
GII/1・GI/?	20602X8 ²⁾	1994.12	1.2E+02	○	○	△ ⁴⁾

G II 検出系	汚染用糞便	上清のみ定量値	単味血清	G II プール血清	NVプール血清	備考
遺伝子型	使用検体番号	採取年月	(copies/反応)	(対応する1種)	(13種プール)	(19種プール)
GII/1・GI/?	20602X8 ²⁾	1994.12	2.7E+03	○	○	○ ⁴⁾
GII/2	21603S4	2004.4	7.5E+02	○	○	○
GII/3	21914F1	2007.12	2.7E+03	○	×	○
GII/4	21823S2	2006.11	4.5E+04	○	○	○
GII/5	21412S3	2003.2	3.3E+03	○	○	○
GII/6	22103T5	2009.4	2.1E+02	×	×	×
GII/7	21708S15	2005.12	2.1E+03	○	○	○
GII/8	FS/379/00	2000.12	6.6E+01	×	×	×
GII/10	21103F1	2000.3	2.2E+03	○	○	○
GII/12	22019F45	2009.3	1.0E+02	×	×	×
GI/8・GII/?	21620W3 ¹⁾	2005.3	7.6E+03	○	○	○ ³⁾

○: 2wellとも10copies/反応以上の定量値にて検出

△: ○の基準は満たさないが検出

×: 検出されず

1),2) それぞれ同一の糞便検体

3),4) それぞれ同一の抽出RNA使用

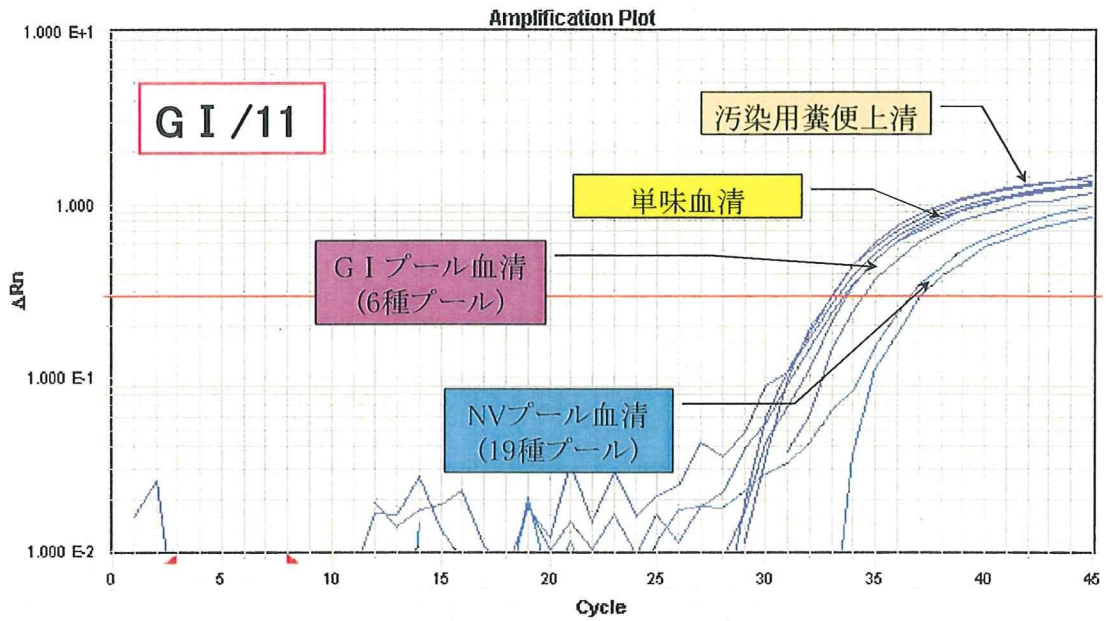


図5 GI/11のNVについての回収検討(増幅曲線)

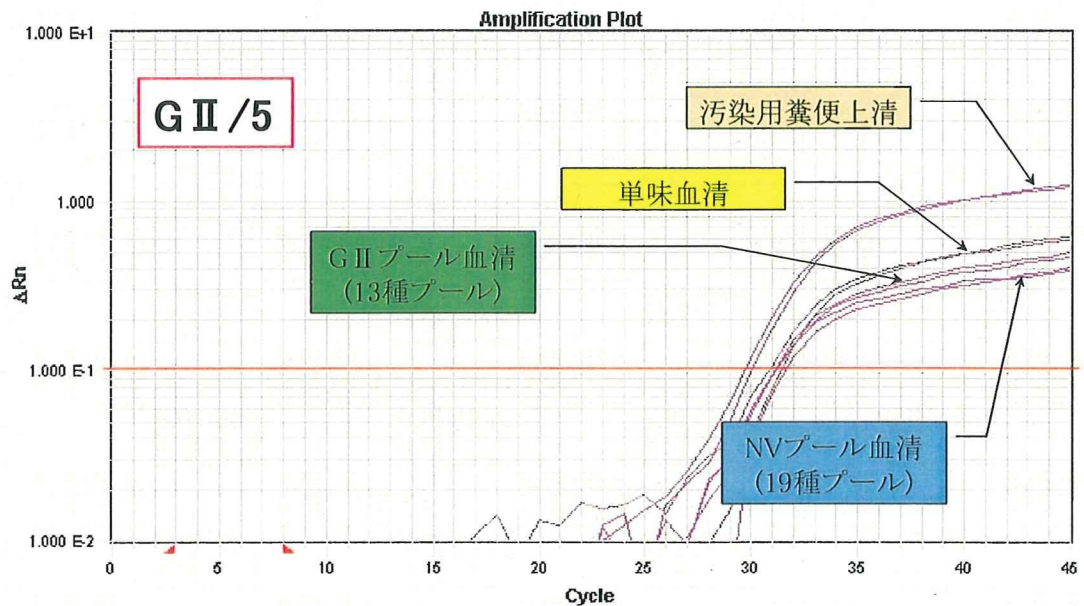


図6 GI/5のNVについての回収検討(増幅曲線)

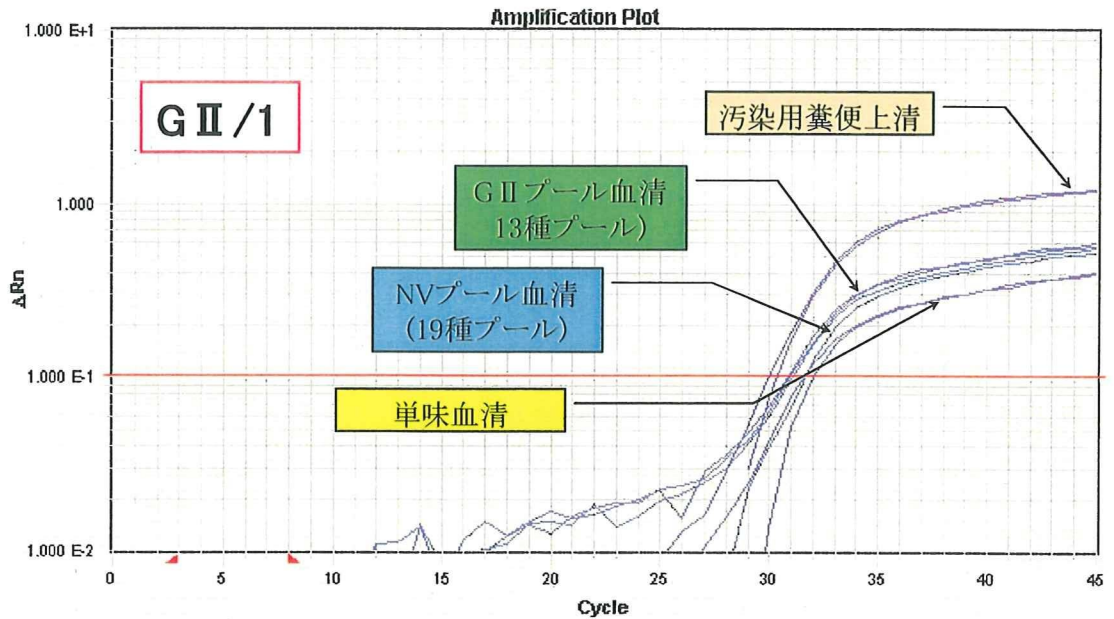


図7 G II/1 のNVについての回収検討 (増幅曲線)

表3 各遺伝子型のNVにおける検討 (抗血清およびモノクローナル抗体使用)

G I 検出系		汚染用糞便	上清のみ定量値	単味血清	G I プール血清	NV プール血清	G I specific	broad
遺伝子型	使用検体番号	採取年月	(copies/反応)	(対応する1種)	(6種 プール)	(19種プール)	(#3912)	(#22,#23MIX)
GI/1	21508T47	2004.3	3.5E+02	○ ¹⁾	○ ¹⁾	○ ¹⁾		
			2.2E+03	○	○	○	×	×
GI/2	21608T4	2004.12	3.0E+01	△ ¹⁾	△ ¹⁾	△ ¹⁾		
			2.0E+03	○	○	○	×	×
GI/3	21618F17	2005.2	2.7E+02	○ ¹⁾	○ ¹⁾	○ ¹⁾		
			4.7E+03	○	○	○	×	×
G II 検出系		汚染用糞便	上清のみ定量値	単味血清	G II プール血清	NV プール血清	G II specific	broad
遺伝子型	使用検体番号	採取年月	(copies/反応)	(対応する1種)	(13種プール)	(19種プール)	(#14)	(#22,#23MIX)
GII/3	21914F1	2007.12	2.7E+03	○ ¹⁾	×	○ ¹⁾		
			1.2E+05	○	×	○	×	×
			6.5E+05	○	○	○	○	△
21504N7	2003.12	2.3E+06	○	○	○	△	○	
GII/6	22103T5	2009.4	2.1E+02	×	×	×		
			2.3E+04	○	×	×	×	×
21301S1	2001.4	1.3E+04	×	×	×	×	×	×
		9.2E+05	○	○	○	○	○	
		6.6E+01	×	×	×	×	×	
GII/8	FS/379/00	2000.12	6.6E+01	×	×	×		
			6.5E+03	○	△	×	×	×
			4.8E+04	○	○	○	×	×
21309N1	2002.1	3.7E+06	○	○	○	○	△	
GII/12	22019F45	2009.3	1.0E+02	×	×	×		
			3.0E+05	○	○	○	○	×
			6.5E+04	○	○	○	○	×
21307F3	2001.12	6.5E+04	○	○	○	○	×	

○: 2wellとも10copies/反応以上の定量値にて検出
 △: ○の基準は満たさないが検出、もしくは抗体なしの場合より低い定量値
 ×: 検出されず
 1) 表2の再掲

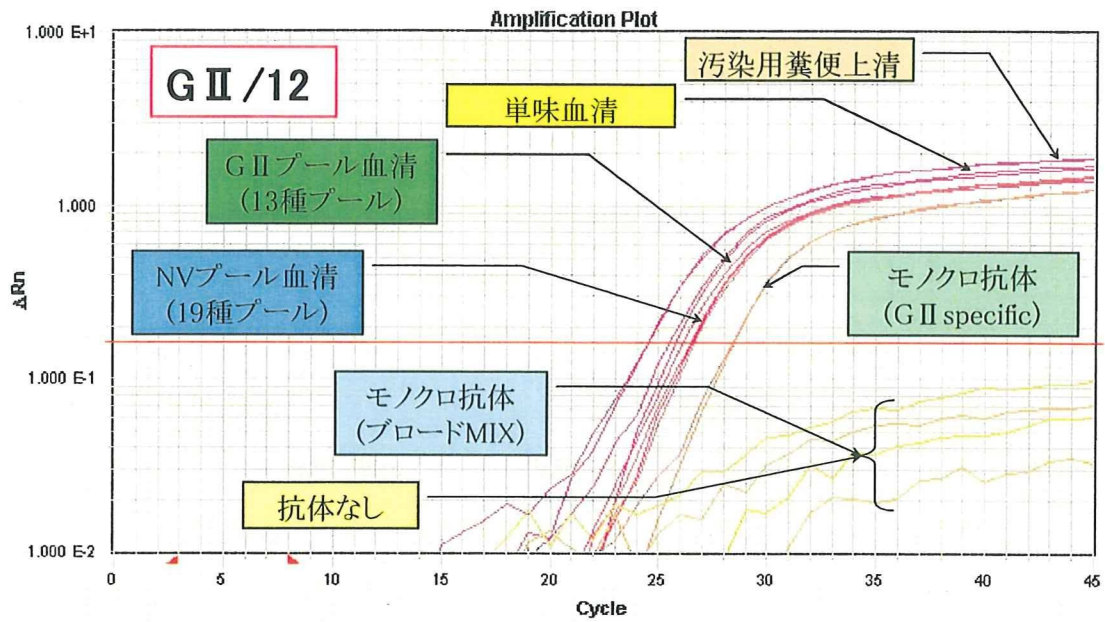


図8 G II/12のNVについての回収検討（増幅曲線）

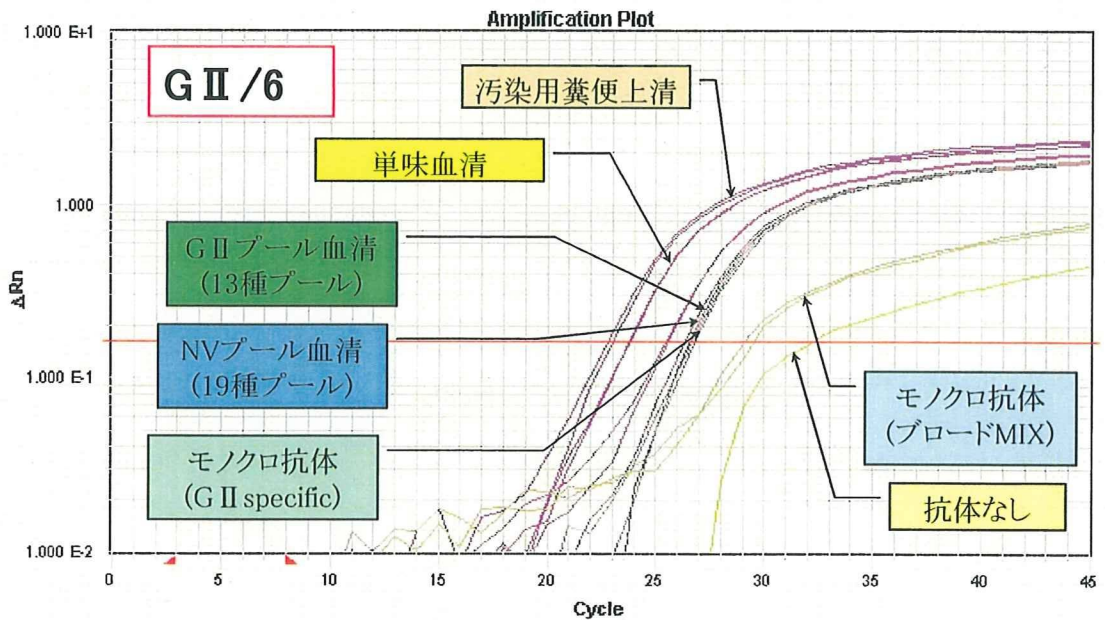


図9 G II/6のNVについての回収検討（増幅曲線）

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

研究協力者: 入谷 展弘 (大阪市立環境科学研究所)

研究分担者: 田中 智之 (堺市衛生研究所)

研究協力者: 改田 厚、阿部 仁一郎、久保 英幸
(大阪市立環境科学研究所)

研究要旨:

2008/09 シーズンに大阪府で、最も多く検出されたノロウイルス (NV) の遺伝子型は GII.4 型 (55.7%) であり、次いで GII.6 型 (24.6%) であった。2008/09 シーズンの GII.6 型 NV 事例の発生数は、大阪府では 1996/97 シーズン以降で最も多かった。これらの GII.6 型 NV 事例は大阪府内の保育園や小学校を中心に認められ、ヒトからヒトへ直接感染が広がったものと考えられた。本 GII.6 型 NV 株のほとんどは、遺伝的に同一あるいは近縁であり、過去に検出された GII.6 型 NV 株とは異なっていた。

A. 研究目的

ノロウイルス (NV) は、ウイルス性食中毒や急性胃腸炎の主な原因である。最近では特定の遺伝子型 (GII.4 型) の変異株の出現とその世界的な大流行が報告されている。しかし、NV には多数の遺伝子型が存在しており、GII.4 型以外の遺伝子型の動向にも注意し、流行解析することが NV の遺伝子変異と流行の解明に重要であると考えられる。今回、2008/09 シーズンに大阪府で、大きく増加した GII.6 型 NV について、その流行像と要因を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1. 材料

2008 年 9 月～2009 年 8 月の期間

(2008/09 シーズン) に NV が検出された非細菌性胃腸炎 61 事例を対象に遺伝子型別を行った。また 1996/97 シーズン以降に大阪府で集団事例および小児散発性胃腸炎例から検出された GII.6 型 NV 株を解析に用いた。

2. NV の遺伝子型別

NV 陽性検体について、Kojima ら (JVM 100, 107-114, 2002) のプライマー (GI 用: G1SKF/R、GII 用: G2SKF/R) を用いて Capsid N terminal/Shell domain (N/S) 領域を増幅し、ダイレクトシーケンス法により、オートシーケンサー (ABI PRISM310 または 3130, ABI) で塩基配列を決定した。NV の遺伝子型別は Katayama らの方法 (Virology 299, 225-239, 2002) に基づいて行い、遺伝子型番号は

Kageyama ら (JCM 42, 2988-2995, 2004) に従った。複数の NV 陽性検体が認められた事例については、少なくとも陽性 2 検体以上について遺伝子型別を行った。

(倫理面への配慮)

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

C. 研究結果

大阪市における 2008/09 シーズンの NV 事例は、10 月から発生が認められるようになり、1 月の発生が最も多かった (図 1)。検出された NV 株の遺伝子型は、少なくとも 10 種類 (GI: 4 種類、GII: 6 種類) 認められ、GII.4 型が最も多く (34 事例、55.7%)、次いで GII.6 型が多かった (15 事例、24.6%)。GII.6 型 NV 事例の発生は、2008 年 12 月から 2009 年 5 月まで認められ、すべてヒトからヒトへの直接感染が疑われた。発生施設は、13 事例 (86.7%) が保育園および小学校での発生であり、高校 1 事例、特別養護老人施設 1 事例であった。患者の主症状は嘔吐・下痢であり、他の遺伝子型の NV 事例患者と比較して、症状の差は特に認められなかった。GII.6 型 NV 事例の地理的・継時的発生状況から、2008 年 12 月に大阪市北部で集中的な発生が認められ、次第に市内全域に拡大していく状況が認められた。

過去 12 シーズン (1996/97~2007/08) において大阪市で GII.6 型 NV が検出された集団事例は 31 事例 (図 2) であり、1 シーズンに集中した発生は認められなかった。これらの GII.6 型 NV 事例は、カキの喫食を伴う場合が 12 事例 (38.7%)、カキ以外の食品が疑われた場合が 5 事例

(16.1%) であった。ヒトからヒトへの感染が疑われた場合は 3 事例 (9.7%、保育園 1 事例、小学校 1 事例、特別養護老人施設 1 事例) のみであり、2008/09 シーズンの GII.6 型 NV 事例とは異なっていた。小児散発例では、検出数は少ない (22 例、5.9%) が、ほとんどのシーズンで GII.6 型 NV は検出されていた (図 2)。

1996/97~2008/09 シーズンに大阪市で検出された 70 株 (集団事例由来 46 株、小児散発例由来 24 株) の GII.6 型 NV について、Capsid N/S 領域における遺伝子を比較したところ、大きく 3 つの遺伝的クラスターに分類された (図 3)。2008/09 シーズンに検出された GII.6 型 NV 17 株 (集団事例由来 15 株、小児散発例由来 2 株) のうち集団事例由来 2 株を除いた 15 株は、同じクラスター (図 3、08/09 GII.6 クラスター) に分類され、塩基配列の相同性が 97.8%以上であった。他のすべての株は、別の 2 つのクラスターに分類され、クラスター間の塩基配列の相同性は、86.6~93.8%であった。2008/09 シーズンに検出された GII.6 型 NV 株のうち、08/09 GII.6 クラスターと異なるクラスターに分類された集団事例由来 2 株 (図 3、HC08-25、HC08-33) は、2008 年 12 月に検出されたものであった。

D. 考察

大阪市における NV の分子疫学的解析から、過去 12 シーズンの期間に GII.6 型 NV による大きな流行は認められなかった。しかし、ほとんどのシーズンで GII.6 型は検出されており、検出頻度が高い遺伝子型であった。これらの期間に検出され

た GII.6 型 NV 株は、大きく 2 つの遺伝的クラスターに分類され、過去 12 シーズンは、これらのクラスターに分類される株が併存して流行していたものと考えられた。

2008/09 シーズンには、GII.6 型 NV による事例数が大きく増加し、大阪市ではシーズンを通して発生が認められた。これらの GII.6 型 NV は、12 月に検出された 2 株を除いて、遺伝的に同一あるいは近縁であり、過去に検出された株とは異なっていた。したがって、本株は 12 月頃に大阪市に出現して、食品を介さずに子どもを中心にヒトからヒトへの直接感染によって、拡大していったものと推測された。また、同時期に大阪市以外の地域でも、本株が検出されており、さらに大きな流行を起こしていたことが示唆された。本株の実際の流行規模や拡大状況を明らかにするためには他地域での流行実態も調べ、あわせて解析する必要がある。2009 年 6 月以降は、大阪市内で GII.6 型 NV は検出されておらず、流行は終息したものと考えられた。

最近、世界的な大流行を起こしている GII.4 型 NV は、遺伝子変異との関連性が報告されている。今回の GII.6 型 NV も、過去に検出された株とは遺伝的に異なる株であったことが大きく流行した原因の一つであると考えられた。今後、GII.4 型以外の遺伝子型が大きく流行する可能性もあり、NV 遺伝子の変異と流行の解明には、GII.4 型以外の遺伝子型の流行についても詳細に解析していく必要がある。

E. 結論

2008/09 シーズンに大阪市内では、園児、小学生を中心に遺伝的に同一あるいは近縁な GII.6 型 NV が流行していた。これらは、ヒトからヒトへ直接感染して拡大したものと考えられた。大阪市内で過去に検出した GII.6 株の解析から、2008/09 シーズンに流行した GII.6 株は、過去の株とは遺伝的に異なっていた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) J Siebenga, H Vennema, DP Zheng, J Vinje, 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

2. 学会発表

1) 中田恵子, 左近(田中)直美, 山崎謙治, 加瀬哲男, 高橋和郎, 織田肇, 入谷展弘, 改田厚, 久保英幸, 阿部仁一郎, 後藤薫, 長谷篤, 三好龍也, 内野清子, 高橋幸三, 田中智之: ノロウイルスをモデルとした大阪府全域での健康危機管理のための情報システムの構築, 平成 21 年度地方衛生研究所全国協議会近畿支部ウイルス部会総会, 大阪市, 2009 年 9 月

2) 野田衛, 阿部勝彦, 吉澄志磨, 植木洋, 庄司美加, 大金映子, 坂野智恵子, 古屋由美子, 足立聡, 滝澤剛則, 中村一哉, 左近(田中)直美, 中田恵子, 入谷展弘, 福田伸治, 松本知美, 岡本玲子, 大塚有加, 山下育孝, 西尾治 : コラボスタディによるカキからのウイルス検出法の評価と課題, 第98回日本食品衛生学会, 函館市, 2009年10月

3) 中田恵子, 左近(田中)直美, 入谷展弘, 三好龍也, 改田厚, 久保英幸, 阿部仁一郎, 後藤薫, 長谷篤, 内野清子, 高橋幸三, 田中智之, 山崎謙治, 加瀬哲男, 高橋和郎, 織田肇 : 大阪府・大阪市・堺市の連携による大阪府内におけるノロウイルスの流行解析, 第57回日本ウイルス学会, 東京都, 2009年10月

4) 中田恵子, 左近(田中)直美, 入谷展弘, 三好龍也, 改田厚, 久保英幸, 阿部仁一郎, 後藤薫, 長谷篤, 内野清子, 高橋幸三, 田中智之, 山崎謙治, 加瀬哲男, 高橋和郎, 織田肇 : 大阪府・大阪市・堺市の連携による大阪府内におけるノロウイルスの流行解析, 第25回地方衛生研究所全国協議会近畿支部疫学情報部会定期研究会, 京都市, 2009年12月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 実用新案登録

なし

2. その他

なし

3. 特許取得

なし

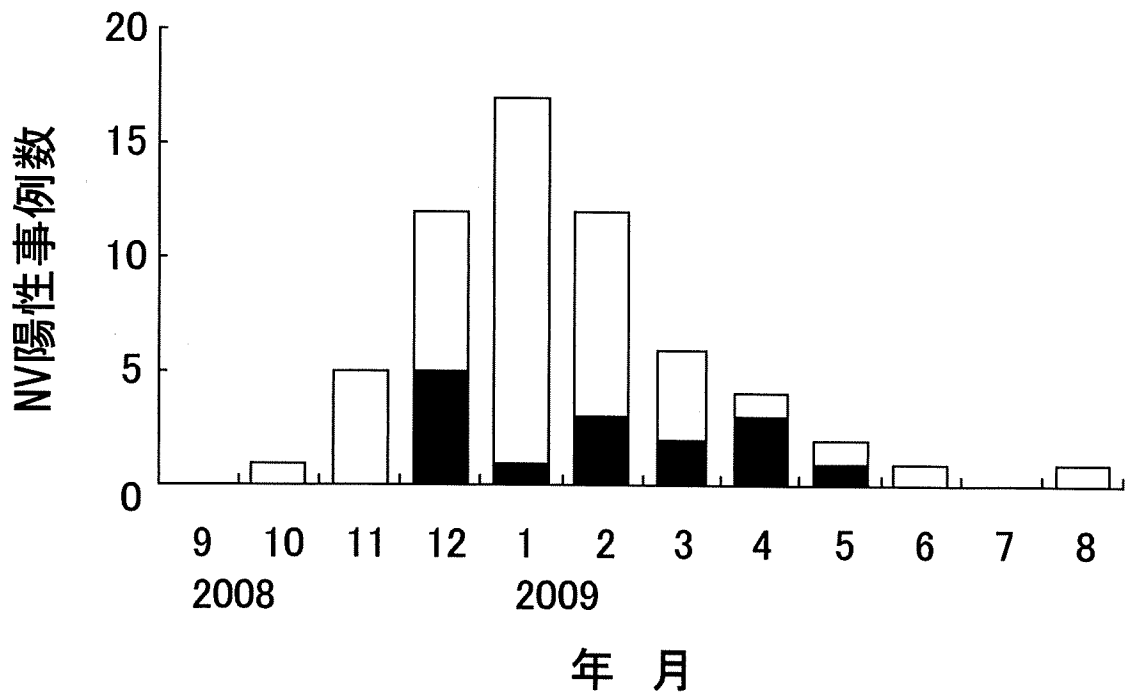


図1 大阪市における胃腸炎事例からの月別NV検出状況

■ GII.6型、□ その他の遺伝子型

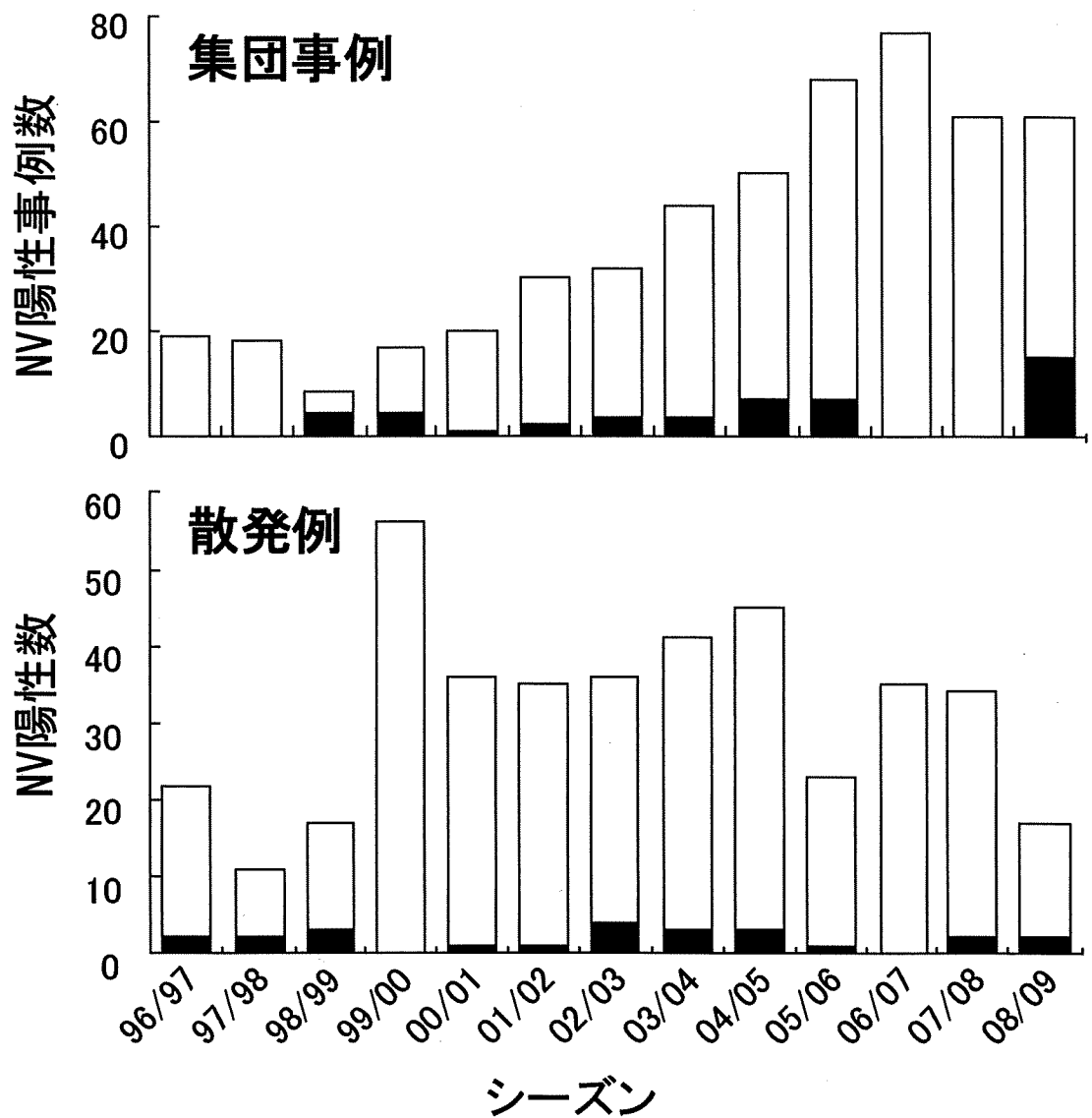


図2 大阪市における GII.6 型 NV 検出状況

■ GII.6 型、□ その他の遺伝子型

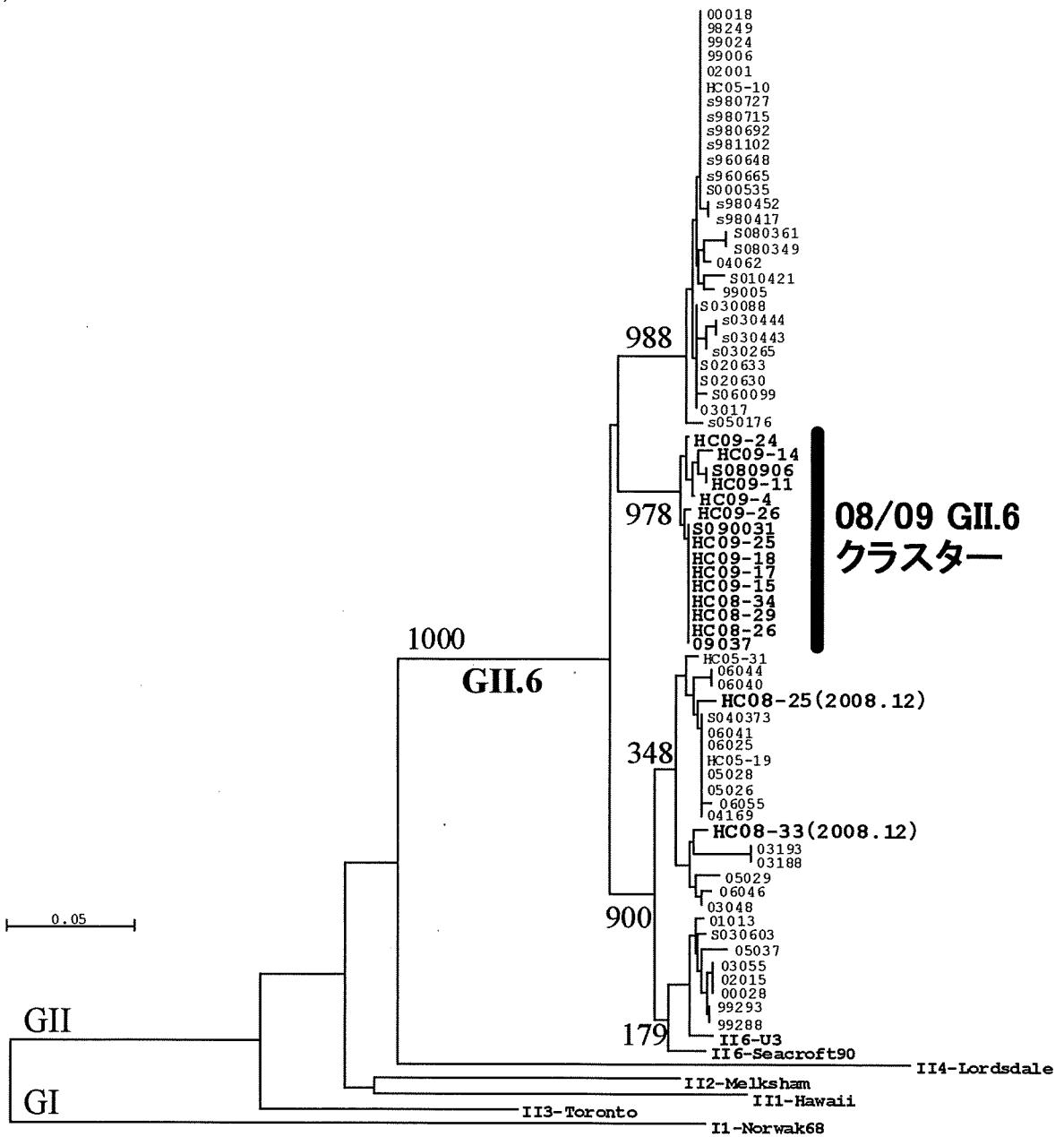


図3 大阪市で検出した GII.6 型 NV 株の Capsid N/S 領域における分子系統樹

太字 : 2008/09 シーズンに検出された株

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」

研究協力報告書

環境と臨床検体からみた NV 流行の解析

研究協力者: 内野清子 (堺市衛生研究所)

研究分担者: 田中智之 (堺市衛生研究所)

研究協力者: 三好龍也、高橋幸三、松尾光子、吉田永祥

(堺市衛生研究所)

研究要旨:

2008 年 10 月から 2010 年 1 月にかけて、環境面として下水、臨床面として散発および集団発生由来の臨床検体からの NV 遺伝子の検出・解析を行った。

NV 遺伝子型別検出状況では、臨床検体は GI/4, 8, GII/2, 3, 4 の計 5 種類が関与し、環境検体は GI/4, 8, GII/2, 4, 12 の 5 種類が検出された。今回の調査から、2008/2009 シーズンは低流行状況を示したが、GII/4 は依然として流行の主流株であった。しかし、2010 年 1 月の環境水の調査では NV 遺伝子量の増加がみられた。

環境検体からの検出は変動要因が考えられるが、環境と臨床検体からの NV 解析は NV 流行の全体像をより明らかにすると考えられた。

A. 研究目的

NV 感染は散発・集団発生として表面化するばかりでなく、不顕性感染等も存在するため、全体像を捕らえることは難しい。また、低流行下での地域浸淫状況なども捉えがたい。我々は、散発・集団発生の感染性胃腸炎患者由来の臨床検体と下水由来の環境検体の両面からノロウイルス(NV)検出を行い、市内における NV 感染状況の把握を試みている。2008 年 10 月から 2010 年 1 月にかけて得られた成績を解析し、堺市内の NV 流行について考察する。

B. 研究材料と方法

1. 材料

1) 集団および散発発生臨床検体

2008 年 10 月から 2010 年 1 月にかけて、堺市内で発生した集団発生 12 事例から得られた RT-PCR 法陽性 16 株および散発発生から得られた 12 株、合計 27 株を用いた。

2) 環境検体

2008 年 10 月から 2010 年 1 月にかけて、堺市内の下水 1 定点と下水処理場 3 定点、計 4 定点から、毎月 1 回、2000ml 採取した(図 1)。(2009 年 5、7、8 月は実施せず。)これら下水 13 検体、下水処理場の流入水 39、計 52 検体を用いた。

2. 方法

1) 集団発生および散発発生臨床検体

臨床検体由来の NV 陽性株は、NV 遺伝子 Capsid 領域の 5' 側約 280bp の塩基配列を決定し、系統樹解析により遺伝子型を判定

した。

2) 環境検体

採取した 2,000ml の水は粗遠心後、上清 1,000ml を分取し、HCl で pH3.5 に調整し、HA フィルター (450 μ l) でウイルスを吸着濾過し、フィルターを細断後、2.0ml の pH10.5 グリシン buffer で溶出を行い、HCl で pH6.5 に調整しサンプルとした。サンプルから QIAamp viral mini RNA キットにて RNA 抽出を行い、DNase I 処理を行った後、random hexamer を用いて Super Script II RT で逆転写し、cDNA 合成を行った。リアルタイム PCR 法による NV 定量では、プライマーは COG1F/COG1R と COG2F/COG2R、プローブはそれぞれ RING1-TPa および RING1-TPb、RING2AL-TP を用い、ABI PRISM 7900 で G I および G II それぞれの NV を測定後、採取水 1ml 当たりのコピー数を算出した。

NV 遺伝子型別検査では、1st PCR は COG1F/G1-SKR、COG2F/G2-SKR を、2ndPCR には G1-SKF/G1-SKR、G2-SKF/G2-SKR を用い、G I および G II それぞれの Capsid 領域を増幅し、十分な遺伝子産物が得られた PCR 産物を TA クローニングベクターに挿入して Capsid 領域 5' 側約 280bp の塩基配列を決定した。また、系統樹は近隣結合法によって作製した

(倫理面への配慮)

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

C. 研究結果

2008 年 10 月から 2010 年 1 月の環境水からの NV 測定結果では、G I および G II ともに、感染性胃腸炎流行にほぼ呼応して増加がみられた。NV 遺伝子コピー数は、G I より

も G II の方が高く検出された (図 2.)。

2008/2009 シーズンは NVGII が最も高かったのは 2009 年 1 月 A 定点で、採取水 1ml 当たり 1,288copy であったが、2009/2010 シーズンは 2010 年 1 月の A および B 定点で採取水 1ml 当たりそれぞれ 24,532copy、27,927copy と高値を示し、今後の流行状況に注意を要する結果であった。

NV 遺伝子型別検出状況をみると、臨床検体では G I/4, 8、G II/2, 3, 4 の計 5 種類が関与していた (図 3.)。環境検体では G I/4, 8、G II/2, 4, 12 の 5 種類が検出された (表 1.)。この結果から当市全体では少なくとも、G I が 2 種類、G II が 4 種類、計 6 種類の NV の侵入・暴露が推測された。

また、集団発生では G II/4 検出事例が最も多く 38%、G I/4 および G II/2 事例が各 25% であったが、散发発生では G II/4 が 67% を占めた。環境検体からは広範囲且つ高頻度で G II/4 が検出された。

環境水の NV 遺伝子の塩基配列解析では、同時期に集団発生から検出された NV 遺伝子と相同性の高いウイルスが検出された (図 4.)。

D. 考察

環境と臨床の両面から NV 遺伝子解析を行ったところ、2008/2009 シーズンは低流行であったが、これまでの成績と同様 G II/4 が流行の優位株であった。臨床検体では 5 種類、環境検体では 4 種類の NV の侵入・暴露が推測され、関与遺伝子種類も少ない状況であった。環境検体からの検出は気象に左右されることや採水のタイミングなど変動要因があるが、症状として表面化しない不顕性感染等の NV も補足し得ると考えら

れる。2008/2009 シーズンは環境と臨床の両面からも低流行状況を推測する結果となった。しかし、2010年1月は環境からのNV遺伝子量の増加傾向が伺われNV感染者の増加が推測された。

また、環境水のNV遺伝子の塩基配列解析では、同時期に集団発生から検出されたNV遺伝子と相同性の高いウイルスが検出され、環境汚染とNV感染症には密接な関連性のあることが示唆された。

E. 結論

NV感染は散発・集団発生として表面化するばかりでなく、不顕性感染等も存在するため、全体像を捕らえることは難しく、地域浸淫状況なども捉えがたい。

環境と臨床の両面からのNV遺伝子検出・解析することは、低流行状況であっても多様な遺伝子型をもつNV流行の全体像をより明らかにするための有用な方法であると考ええる。

謝辞：検体採取にご協力いただきました堺市下水道部に感謝いたします。

F. 研究発表

1. 誌上发表

- (1) 田中智之、三好龍也、内野清子. ノロウイルス迅速診断法. 診断と治療 97(9); 1728-1731, 2009

2) 学会発表

- (1) Tomoyuki Tanaka, Daisuke Kato, Kunio /Kamata, Tatsuya Miyoshi, Kiyoko Uchino, Hisaaki Yoshida, Hitoshi Tajiri, Masumi Okuda, Yoshiko Yamashita, Noritoshi Kitamoto and Naokazu Takeda.

Improved Norovirus rapid diagnostic kit, immunochromatography(IC) kit

-its advantages as a prophylactic tool-

The 4th Bangladesh-Japan Joint International Conference on Microbiology, Food safety and Hygiene. 2009.3 Nara, Japan

(2) 中田恵子、左近(田中)直美、入谷展弘、三好龍也、改田 厚、久保英幸、阿部仁一郎、後藤 薫、長谷 篤、内野清子、高橋幸三、田中智之、山崎謙治、加瀬哲男、高橋和郎、織田 肇

大阪府・大阪市・堺市の連携による大阪府内におけるノロウイルスの流行解析 第57回日本ウイルス学会学術集会 2009年10月 東京都

(3) 三好龍也、内野清子、李 天成、武田直和、北元憲利、田中智之 野生イノシシのE型肝炎ウイルス保有状況調査

第57回日本ウイルス学会学術集会 2009年10月 東京都

(4) Tomoyuki Tanaka, Hitoshi Tajiri, Masumi Okuda, Yoshiko Nakayama, Tatsuya Miyoshi, Kiyoko Uchino, Hisaaki Yoshida, Noritoshi Kitamoto Daisuke Kato, Kunio Kamata and Naokazu Takeda.

DEVELOPED NOROVIRUS ANTIGEN DETECTION

IMMUNOCHROMATOGRPHY(IC) KIT WITH ADVANTAGES OF PROPHYLACTIC TRIAGE IN PEDIATRIC WARDS. The 13th Asian Pacific Congress of Pediatrics and 3rd Asian Pacific Congress of Pediatric Nursing. 2009.10. Shanghai, China

G.知的財産の出願・登録状況

なし

図1. 堺市内 下水採水定点

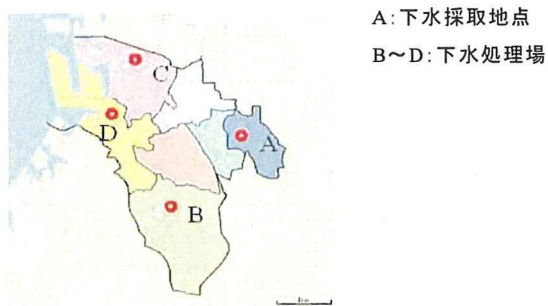


図2. 環境検体の NV リアルタイム PCR 測定結果

