

200939015B

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 19 年度～21 年度 総合研究報告書

研究代表者 野田 衛

平成 22 (2010) 年 3 月

目 次

I. 総合研究報告書

食品中のウイルスの制御に関する研究

野田 衛 ----- 3

II. 研究成果の刊行に関する一覧

----- 89

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 19 年度～21 年度 総合研究報告書

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」

総合研究報告書

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：食品媒介性ウイルスとして重要なノロウイルス(NoV)、サポウイルス(SaV)、A型肝炎ウイルス(HAV)、E型肝炎ウイルス(HEV)の制御に必要な基盤の確立を目的に、食品等からのウイルス検出法や迅速診断法の開発、培養法の検討、食品や環境の汚染実態の把握、不活化条件の検討、流行ウイルスの遺伝子及び構造解析、組織血液型抗原の結合性分析、抗体保有調査、予防対策に必要な疫学データの収集と分析等を実施した。G3型HEVを用いてPLC/PRF/5細胞による培養に成功した。G4型HEVは豚に感染性を有することを明らかにした。HEVの加熱、消毒剤、紫外線に対する不活化条件を明らかにした。養豚場の飼育豚は120日齢までにHEVに感染していた。めん羊、牛はHEVの主要な宿主ではなかった。イノシシの10%からHEVを検出した。肝臓等からの感度のよいHEV検出法および簡便な遺伝子型別法を確立した。黄色ブドウ球菌由来IgG結合性蛋白質を利用した食品からの高感度で簡便なNoV検出法(パンソルビン・トラップ法)を開発した。SaV、HEVの単クローン抗体や抗血清等を作成し、免疫学的診断法の開発に向けての道を開いた。免疫クロマト法を利用した迅速NoV検出法、掃除機内のごみからの簡便なウイルス検出法、Lamp法によるHAVの迅速検査法を開発した。GI NoVはA型抗原、GII NoVはB型抗原に結合し易いことを見出した。市販パック詰め生カキの保存液からNoVを検出した。市販パック中のカキのウイルス汚染量は対数正規分布を示した。食中毒原因カキのNoV汚染量は700～7,500コピーに分布し、カキ2個喫食での発症率は83%であった。アミラーゼ処理はカキからのノロウイルス遺伝子抽出に有用である。NoV患者の嘔吐物中には 10^4 ～ 10^9 /g程度のNoVが存在し、嘔吐後の患者の口腔内にもウイルスが最大で約21時間残存した。カキ養殖場のNoV汚染のピークは概ね1月以降であった。患者から検出される型以外に多数の遺伝子型のNoVが下水から検出した。健康調理従事者からのNoV検出率は0.2%(通年)～6.6%(流行期)であり、調理従事者の食品汚染による食中毒事例の約67%は不顕性感染者によった。調理従事者16名の糞便中のNoVの陰性が確認されるまでの日数は21.2日であった。一般家庭の掃除機内のゴミからNoVとSaVを検出した。GII.4流行株は毎年新たな変異株が出現したが、2006年以降EU-2006b型が常に主流で、その構造蛋白の外側表面に

多くの変化が生じていた。新型の GII.4 や GII.6 変異株を検出した。GII.4 は他の遺伝子型と比べ糞便中に多くのウイルス粒子が排出されることや抗体保有率が高かった。SaV は、患者便から高いレベルで長時間検出され、また、不顕性感染者、下水、市販カキあるいはアサリを原因食とする食中毒事例の原因食品から検出された。

研究代表者(平成 19 年度～20 年度)

武田 直和 国立感染症研究所

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
 斎藤 博之 秋田県健康環境センター
 恒光 裕 動物衛生研究所
 米山 徹夫 国立感染症研究所
 本村 和嗣 同上
 横山 勝 同上
 李 天成 同上
 岡 智一郎 同上
 グラントハンスマン 同上
 白土 東子 同上

研究協力者

内野 清子 堺市衛生研究所
 三好 龍也 同上
 吉田 永祥 同上
 高橋 幸三 同上
 中村 武 同上
 松尾 光子 同上
 田尻 仁 大阪府立急性、医療センター小児科
 奥田真珠美 和歌山労災病院小児科
 中山 佳子 信州大学医学部小児科
 皆川 洋子 愛知県衛生研究所
 山下 照夫 同上
 川口まり子 同上

池田 秀利 動物衛生研究所
 宮崎 綾子 同上
 鈴木 孝子 同上
 山田 学 同上
 服部奈千子 同上
 吉澄 志磨 北海道立衛生研究所
 石田勢津子 同上
 三好 正浩 同上
 奥井 登代 同上
 三上 稔之 青森県環境保健センター
 石川 和子 同上
 熊谷 邦彦 同上
 吉田 綾子 同上
 筒井 理華 同上
 井上 治 同上
 高橋 朱美 岩手県環境保健研究センター
 高橋 知子 同上
 高橋 雅輝 同上
 蛇口 哲夫 同上
 齋藤 幸一 同上
 植木 洋 宮城県環境保健センター
 庄司 美加 同上
 田村 務 新潟県保健環境科学研究所
 滝澤 剛則 富山県衛生研究所
 中村 一哉 同上
 小原 真弓 同上
 長谷川澄代 同上
 岩井 雅恵 同上

堀元 栄詞	同上	増本 久人	同上
倉田 毅	同上	平野 敬之	同上
東方 美保	福井県衛生環境研究センター	南 亮仁	同上
篠崎 邦子	千葉県衛生研究所	原田 誠也	熊本県保健環境科学研究所
岡田 峰幸	同上	西村 浩一	同上
林 志直	東京都健康安全研究センター	清田 直子	同上
吉田 徹也	長野県環境保全研究所	松岡由美子	熊本市環境総合研究所
白石 崇	同上	森田 美加	同上
小林 正人	同上	川本 大輔	福岡市保健環境研究所
粕尾しず子	同上	小河 正雄	大分県衛生環境研究センター
畔上 由佳	同上	田代 潔子	同上
内山友里恵	同上	長岡 健朗	同上
薩摩林一代	同上	岩切 章	宮崎県衛生環境研究所
笠原ひとみ	同上	三浦 美穂	同上
上田ひろみ	同上	北野 智一	同上
長瀬 博	同上	山本 正悟	同上
藤田 暁	同上	藤原 慶一	千葉大学
入谷 展弘	大阪市環境科学研究所	柴田伸一郎	名古屋市衛生研究所
改田 厚	同上	大内 良美	滋賀県衛生研究所
阿部仁一郎	同上	長谷川嘉子	同上
久保 英彦	同上	岡本 玲子	山口県環境保健センター
北元 憲利	兵庫県立大学	有田 知子	日本スポーツ振興センター
飯塚 節子	島根県保健環境科学研究所	谷口 力夫	杉並保健所
小村 珠喜	同上	小暮 実	中央区保健所
田原 研司	同上	清原 知子	国立感染症研究所
福田 伸治	広島県立総合技術研究所 保健環境センター	島崎 典子	同上
山下 育孝	愛媛県立衛生環境研究所	下地 貴志	同上
近藤 玲子	同上	西尾 治	同上
大塚 有加	同上	劉 蘭軍	同上
市川 高子	同上	片山 和彦	同上
大瀬戸光明	同上	佐藤 裕徳	同上
船津丸貞幸	佐賀県衛生薬業センター	(順不同)	

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. A型肝炎ウイルス

1-1 RT-RAMP法によるA型肝炎ウイルスの検出

RT-LAMP kit(栄研化学)を用いた比濁法によるリアルタイム検出を行った。

2. E型肝炎ウイルス

2-1 細胞培養系の樹立

E型肝炎ウイルス感染ブタ由来の肝臓から作成した肝細胞乳剤をPLC/PRF/5細胞に接種し、培養上清を二、三日置きに採取した。細胞培養上清のウイルス抗原、およびウイルス遺伝子を測定し、培養細胞での増殖性を評価した。さらに4種類異なる培地組成:培地199、培地199+Mg⁺、培地199+培地DME、培地199+培地DMEM+Mg⁺、それぞれ、37℃、36℃で培養し、ウイルスの増殖効率を比較した。

2-2 E型肝炎ウイルスの不活化条件の検討

G3およびG4 E型肝炎ウイルスを用いて、熱安定性(37℃~100℃、分間から1時間)、消毒剤(異なる濃度のNaClO(62.5ppm~1000ppm)と室温30分間反応)および紫外線(10, 20, 30, 60, 120分間50uw強度の紫外線照射)を調べた。各処理の後、PLC/PRF/5細胞に接種し、培養上清を三、四日置きに採取した。細胞培養上清のウイルス抗原およびウイルス遺伝子を測定し、感染性を評価した。

2-3 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型肝炎ウイルスをノトバイオト豚2頭に接種し、糞便ならびに血清中のE型肝炎ウイルス量をリアルタイムPCR法により測定した。血清中での抗体応答はELISA法で検査した。

2-4 豚、めん羊および牛のE型肝炎ウイルス抗体検査とウイルス遺伝子保有調査

8県18農場より計24回、肉豚発育ステージ別(30日、60日、90日、120日、150日および180日齢)に血清と糞便、8農場より計14回、母豚血清を採取し、血清についてELISA法でE型肝炎ウイルス抗体検査、一部の血清ならびに糞便についてE型肝炎ウイルス遺伝子検査を行った。5県14農場より採材しためん羊血清計204例についてELISA法によりE型肝炎ウイルス抗体検査を実施した。また、ELISA反応の特異性を検討するため、本法で高値を示した血清10例について、予め陽性抗原あるいは陰性抗原と反応させた後にELISA法を行った(吸収操作)。

北海道・東北計7市町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パッケージのE型肝炎ウイルス遺伝子検査を行った。養牛と養豚の両方を実施している農場から牛血清91例を採取してE型肝炎ウイルス抗体検査とE型肝炎ウイルス遺伝子検査を行った。

2-5 豚、めん羊、シカのE型肝炎ウイルス抗体検査と検査法の検討

熊本県内で捕獲されたイノシシ118頭190検体(筋肉:72、肝臓:86、血液:32)とシカ59頭125検体(筋肉:40、肝臓:59、血液:26)を採取し、Nested RT-PCR法でE型肝炎ウイルスの汚染実態調査を実施した。制限酵素切断パターンによる簡便な遺伝子型別法および筋肉や肝臓等からの有効な検査法を確立するために、検体の処理法、E型肝炎ウイルス-RNA抽出法及びRT-PCR法の標的部位(ORF1、ORF2)を検討した。

3. ノロウイルス、サポウイルス

3-1 食品等からのウイルス検出法の開発・改良

3-1-1 パンソルビン・トラップ法による食品からの検出

様々な形状の食品をノロウイルス陽性の糞便で汚染させたものを被験体とし、ウイルスを効率よく回収・検出できるパントラ法の開発を進めた。パントラ法の実用性を高めるために、各種酵素処理、超音波処理等の前処理、緩衝液の組成やRNA抽出法、及びPCRの反応条件等について最適化を行った。現行の食品検査で汎用されているPEG沈澱法によるNV濃縮を比較した。

3-1-2 表面汚染推定される食品からの検出法

食品からのウイルスの回収に適した溶液について検討した。マグロ赤身表面にノロウイルス GII/4 を添加し乾燥させて検体に 18 種類の試験液を加え軽く混和し、一夜放置後の試験液へのウイルス回収量を調べた。回収率の高い、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。

3-1-3 掃除機内ダストからのノロウイルス検出法の検討とノロウイルス、サポウイルスの汚染実態調査

添加回収試験により、振出し液の種類および振出し条件等について、比較検討した。振出し液は、SDS-TG、滅菌蒸留水、PBS(-)および 0.05%Tween20 加 PBS(-)の 4 種類を用いた。振出し条件としては、振出し時間(1、3、6 および 22 時間)について検討した。また、最も回収率の良い方法を用い、一般家庭におけるダストのノロウイルスおよびサポウイルス汚染実態調査を実施した。

3-2 ノロウイルスと血液型抗原との結合性の解析

様々なノロウイルス遺伝子型に属する VLP を用いて、Carbohydrate-VLPs binding assay および Biacore により各種の血液型抗原との結合パターンを調べた。

3-3 ノロウイルス、サポウイルスの抗原検出法の開発

3-3-1 ノロウイルス抗原検出法の開発と改良

ノロウイルス特異的モノクローナル抗体はウイルス様粒子(VLPs)を抗原とした作製した。評価のための抗原は食中毒事例で収去された検体、臨床検体を用いた。抗原検出系として ELISA 法と Immunochromatography(IC)法の構築を試みた。ELISA 法は多検体測定が可能であるが、測定時間が約 2.5 時間必要である。一方 IC 法は 15 分で結果が得られるが単一検体の測定である。いずれも定法に従って構築した。

3-3-2 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

サポウイルス株間の抗原性の差異を評価するため、複数の株について哺乳動物培養細胞を用いて VLPs を大量発現し、これら VLPs に対する特異抗体を作成した。

3-3-3 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

免疫源として、バキュロウイルスで発現されたレコンビナントサポウイルス-VLPs (GI/1、GI/5、GII/3、GIV/1、GV/1)を用いた。抗原的解析には、ほ乳動物のベクターを用いて作製された GII/2 (Mc10) および GII/3 (C12) VLPs も使用した。免疫法として、経口あるいは腹腔投与を行った。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。抗体の特異性は、競争 ELISA 法により確認した。

3-4 GII/4 流行株の全ゲノム分析及び構造解析

3-4-1 ゲノム分析

2006年05月15日から2009年02月03日の間に、19の道府県で検出したノロウイルス247検体を対象とした。糞便からノロウイルス RNAを抽出した後、Oligo dT₃₀SXN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ノロウイルスゲノムcDNA断片2種（約5.3kb, 2.5kb）をPCR増幅し、direct sequence法により、塩基配列を調べた。

3-4-2 構造解析

ノロウイルス GII/4 キャプシド蛋白質分子モデルは、統合計算化学システム MOE (CCG社、カナダ)を用いて、ホモロジーモデリング法により構築した。鋳型として GII/4 VA387 株のキャプシド蛋白質 P ドメイン単量体構造 (PDB code : 2OBS)を用いた。キャプシド蛋白質 P ドメイン二量体分子モデルは、得られた単量体構造を Norwalk virus キャプシド蛋白質多量体構造 (PDB code : 1IHM) に重ね合わせることで構築した。

3-5 ノロウイルスの抗体保有調査

遺伝子グループ I の 2 種類と遺伝子グループ II の 5 種類のウイルス様粒子(組換えバキュロウイルスで発現)を抗原としたノロウイルス抗体測定法(酵素抗体法)を確立し、愛知県民の年齢階層別の抗体保有状況を調査した。

3-6 食品のノロウイルス汚染実態調査

3-6-1 市販生食用カキのノロウイルス汚染実態調査

市販生カキは、2007年10月～2009年3月に購入の38パック(カキ中腸腺304個、パック水38検体)を用い、リアルタイムPCR法及びRT-PCR法でノロウイルス検出を行い、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定した。

3-6-2 カキにおけるノロウイルスの量的分布と推移およびノロウイルス簡易検出法のカキへの応用

市販カキ(加熱調理用)8パック(1パック当たり10個体)のカキについて、リアルタイムPCR法によりウイルスコピー数を測定した。また、2シーズンの10月中旬から2月中旬に採取した養殖場カキのウイルスコピー数を測定し、カキにおけるノロウイルスの経時推移を調べた。この研究に先立ち開発した簡易検出法とRT-seminested PCR法の検出率を比較した。

3-6-2 カキからのノロウイルス検出法の改良とカキのノロウイルス、サポウイルス検出状況

カキからのノロウイルス遺伝子抽出法である破碎法に、前処理としてアミラーゼ処理を加えた方法の有用性を検討した。

平成19年度から21年度にかけ下水処理水受容河川に垂下したカキ、市販カキを対象にノロウイルス、サポウイルスの検出を試みた。

3-7 ノロウイルス・サポウイルス等による食中毒事例の分析

3-7-1 ノロウイルス等の食中毒事例と検査法における問題点

ウイルス性食中毒発生時に、(推定)原因食品および調理従事者のウイルス検索を積極的に行い、食品の検査については研究班等で開発・改良された検査法を実施し、従来法との比較を行った。また、PCR 酵素による増幅の違い、DNase 処理法のノロウイルス、サポウイルス検出に及ぼす影響を検討した。

3-7-2 ノロウイルスによる食中毒の発生要因に関する調査

北海道において 2007～2009 年度に発生した食中毒事例 13 件を対象として、調理従事者のノロウイルス感染の有無を、事前・事後発症者及び非発症者別に調査した。また、5 件の食中毒事例から得られた 38 検体の食品残品についてノロウイルス遺伝子の定量的検出を行い、原因食品の特定と、食品のノロウイルス汚染量のデータ収集を試みた。

3-7-3 二枚貝の喫食のみられた食中毒事例からの胃腸炎ウイルスの検出

北海道において 2004 年 1 月から 2009 年 3 月までに発生し、道衛研においてノロウイルス検査を実施した非細菌性食中毒のうち、原因疑い食品に二枚貝が含まれていた 12 事例(患者糞便 81 検体、患者吐物 1 検体及び二枚貝喫食調理従事者糞便 5 検体)を対象として、サポウイルス、アストロウイルス、A 群ロタウイ

ルス、C 群ロタウイルス、アデノウイルスについて PCR 検査を実施した。PCR 産物については塩基配列を決定し、近隣結合法により系統樹解析を行った。

3-7-4 感染症事例と食中毒事例の判断における NV 定量検査、遺伝子検査の適用

患者と調理関係者から NV が検出された 3 事例について、NV の定量と遺伝子解析を行い、感染症事例と食中毒事例の行政判断時における検査室データの有用性と限界について検討した。

3-7-5 サポウイルスの疫学解析

2002 年～2007 年における小児科外来急性胃腸炎患者糞便についてウイルスおよび細菌を検出し、ノロウイルス、サポウイルス、ロタウイルス、アストロウイルス、アイチウイルス、エンテロウイルス、病原性大腸菌が占める割合を検討した。2000 年～2008 年のサポウイルスによる集団感染性胃腸炎 23 事例について、サポウイルスの詳細な遺伝子解析と疫学的な解析を行った。このうち 2 事例については、サポウイルスの糞便中排泄期間の解析も行った。また、貝の摂食が原因と疑われた集団感染性胃腸炎 1 事例については原因食材とされた貝からもノロウイルス、サポウイルスの検出を行った。環境中のサポウイルスの存在を検討するため、河川水や貝からのサポウイルスの検出も行った。

3-8 患者及び下水等からのノロウイルス・サポウイルス検出状況

青森県においては、2006 年 10 月から

2009年7月までに発生した集団99事例から得られた1593検体（糞便1097、吐物27、食品220、ふきとり252）を対象にノロウイルスの検出を行い、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定した。

愛媛県においては、2007年1月から2009年12月までの間に、集団発生事例及び散发性胃腸炎患者から得られた検体について、電子顕微鏡法、リアルタイムPCR法または、RT-PCR法を用いてウイルス検索を行った。ノロウイルスあるいは、サポウイルスが検出された場合は、カプシド領域の系統樹解析により遺伝子型別を実施した。

千葉県においては、2008年9月から2010年1月に、千葉県内で発生した急性胃腸炎の集団発生157事例の患者の糞便を対象にリアルタイムPCRまたはRT-PCRノロウイルスの検出を行い、ダイレクトシーケンスにより系統解析を行った。

広島県においては、2000/01年から2008/09年に発生したノロウイルス集団感染事例から検出されたノロウイルスを対象に、原因遺伝子型の年代順の推移を検討した。また、近年の主流である遺伝子型GII.4については糞便中に排泄されるGII.4の動態の解析と構造蛋白質をコードするVP1領域の遺伝子解析を行い、年代順の遺伝子学的変化および特徴を抽出した。

愛知県において、ウイルス性下痢症診断マニュアル(第3版)に従って、流入下水検体や胃腸炎患者の糞便検体についてノロウイルス及びサポウイルスの検出検査をRT-PCR法で実施した。

富山県においては、平成19～21年

に県内で発生したウイルス性胃腸炎集団発生事例の便検体、富山県西部地域に存在する下水処理場で採取される下水流入水、県内5施設の調理従事者あるいは介護従事者の便検体、および、平成18～20年に採取した健常乳幼児便検体を対象に、ノロウイルス及びサポウイルスの遺伝子検出を行い、検出されたノロウイルスのカプシド領域とポリメラーゼ領域の遺伝子解析を行った。

岩手県において、下水道、集落排水および合併浄化槽の流入水および放流水のNVの定量検査を行い、各施設におけるNVの挙動と除去状況を調査し、比較検討した。合併浄化槽では、挙動調査に加え、浄化槽の放流水が流入する河川の河口部にカキを垂下し、NV汚染状況を調査した。

新潟県において、2008年11月から2009年7月に発生した食中毒の疑い事例を含む胃腸炎の集団発生事例及び感染症サーベイランスで採取された患者便を材料とし、ノロウイルスを中心とする胃腸炎ウイルスの検索を行った。検出されたノロウイルスを遺伝子型別し、一部についてVP1遺伝子のP2領域の遺伝子解析を実施した。

大阪市において、2008年9月～2009年8月の期間に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結果、GII/6が多く検出されたため、1996/97シーズン以降に大阪市で集団事例および小児散发性胃腸炎例から検出されたGII.6型NV株と分子疫学的に比較した。

堺市において、下水1定点と下水処理

場 3 定点、計 4 定点から定期的に採取した下水 30 検体、下水処理場の流入水 90、計 120 検体を対象にノロウイルスの検出と遺伝子型別を行い、同期間の集団発生および散发例から検出したノロウイルスと分子疫学的に比較した。

宮崎県において 2009 年 12 月にカキが原因と推定される食中毒事例が 2 事例発生したので、検出された NV の遺伝子解析を行い、株間の近縁性を調べた。

3-9 健康者からのノロウイルス検出状況

千葉県において平成 18 年 10 月から平成 19 年 9 月までの 1 年間、県内 A 市の公的施設 13 施設の調理従事者約 47 名から毎月 1 回提出された糞便検体、計 528 検体を検査対象とした。NV の検出は RT-PCR 法で行った。

東京都において 2007 年 11 月から 2009 年 1 月に高齢者施設の健康な調理従事者 210 施設 1186 名を対象に NV 検索を行い、胃腸炎集団発生について起因ウイルスと遺伝子型を比較した。

3-10 嘔吐物等による感染の疫学的分析

3-10-1 嘔吐物中のノロウイルスの定量および遺伝子解析

長野県において、2007 年に発生した食中毒事例および集団感染症事例で採取された、計 13 検体の嘔吐物について、嘔吐物中のノロウイルスの定量および遺伝子解析を実施した。嘔吐物がノロウイルス陽性となった患者 10 名について、嘔吐の回数と嘔吐物中のノロウイルス量の関連性について検討した。

広島県において 2006 年 10 月から 2007 年 12 月の間に発生し、患者糞便および嘔吐物が採取された集団事例 11 事例から得られた患者糞便 23 検体、吐物 14 検体についてリアルタイム PCR 法によりノロウイルス遺伝子量を測定した。

大阪市において 2001 年 4 月以降に発生した NV 陽性患者から採取された嘔吐物検体を対象にノロウイルスの定量検出と遺伝子型別を行った。

新潟県において、2008 年 1 月及び 2008 年 12 月から 2009 年 1 月に発生したノロウイルスを原因とする胃腸炎の集団発生事例の中の患者から、14 件の嘔吐後のうがい液を採取し、うがい液中のノロウイルス量をリアルタイム PCR 法で測定した。

3-10-2 嘔吐物等の関与したノロウイルス集団発生の疫学的解析

千葉県内で発生した急性胃腸炎集団発生事例 2 事例について患者便、調理従事者便を検査材料とした。NV の検出は、リアルタイム PCR または RT-PCR で行い、PCR 産物のダイレクトシーケンスにより系統解析を行った。

杉並区で発生した嘔吐物等が感染源と推定される乳幼児施設、小学校、高齢者施設における集団感染 56 事例(2004 年 11 月～2007 年 12 月発生)を統計学的に解析した。

3-10-3 NV 集団感染発生後に施設環境に残存する NV の検出

集団発生事例において、嘔吐物等により汚染した室内や廊下等の施設環境について、掃除機による清掃、雑巾による清

拭、次亜塩素酸ナトリウム 200ppm 溶液による清拭と散布、スチームクリーナーによる加熱消毒、乾熱消毒 (90°C30 分間)、送風ファンによる強制換気、高性能フィルター付き掃除機等を実施した。清掃後、環境中に NV が残存するか否かを確認するために、掃除機で室内の塵を吸引し、ダストパック中の塵を検体とし 10% 乳剤を作成し、RT-PCR 法により NV を検査した。

(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

3. A 型肝炎ウイルス

1-1 RT-RAMP 法による A 型肝炎ウイルスの

検出

IA 型の A 型肝炎ウイルス 031 細胞馴化株から抽出したウイルス RNA を A 型肝炎ウイルス RT-LAMP 法の検量線の作成に使用した。Roche の A 型肝炎ウイルス定量キットのスタンダードを参照して、RT-LAMP 法の定量域は 100 コピー/5 μ l 以上で Roche の A 型肝炎ウイルス定量キットとほぼ同等であった。

A 型肝炎患者からの 42 検体を用いて A 型肝炎ウイルス RT-LAMP 法の検出効率を調べた。市販の LightCycler w p 用いたリアルタイム PCR 法と RT-LAMP 法はほぼ同程度の成績であった。

4. E 型肝炎ウイルス

2-1 細胞培養系の樹立

G3 E 型肝炎ウイルス を感染した PLC/PRF/5 細胞の上清に 5 日目から E 型肝炎ウイルス-RNA が検出され、32 日目から E 型肝炎ウイルス構造蛋白が検出された。その後、E 型肝炎ウイルス構造蛋白および E 型肝炎ウイルス-RNA はコンスタントに培養上清から検出され、接種後 10 ヶ月が経った時点でも依然高いレベルを維持している。また、培養上清から分離したウイルスのアミノ酸配列は感染出発材料から分離したウイルスのアミノ酸配列と一致するので、E 型肝炎ウイルスの培養細胞での複製、増殖が確認された。

蛍光抗体を用いた免疫染色法では E 型肝炎ウイルス構造蛋白が細胞質に分布していることが示された。さらに構造蛋白をウェスタンブロット法で解析した結果、糖鎖修飾されることも示唆された。ウイルス最適の条件は培地 199 に 30nmMg+を

加え 36°C で培養することであった。同様、G4E 型肝炎ウイルスも PLC/PRF/5 細胞に感染し、増殖できることが確認された。

2-2 E 型肝炎ウイルスの不活化条件の検討

G3 と G4 E 型肝炎ウイルスと同様、50uw 強度で 30 分間紫外線照射あるいは、125ppm 以上の濃度の消毒剤 NaClO で、30 分処理により、G4 E 型肝炎ウイルスの PLC/PRF/5 細胞に対する感染性が無くなる。つまり以上の条件で E 型肝炎ウイルスを不活化する可能性が示唆された。また、アルコール、クロロホルムに対する抵抗性も示した。ただし、温度の感受性に関して G3 E 型肝炎ウイルスを 60°C 10 分間、65°C 5 分間以上の熱処理により失活することに対して、G4 E 型肝炎ウイルスを失活させるには 60°C 15 分間、65°C 10 分間以上の熱処理が必要である。現在、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ている。遺伝子型によってウイルスの安定性が異なることから、E 型肝炎ウイルスの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。

2-3 E 型肝炎ウイルスの豚感染実験

E 型肝炎ウイルス接種 7 日後 (7PID) より実験豚の糞便ならびに血清中で E 型肝炎ウイルスが検出され、糞便中の E 型肝炎ウイルス量は解剖時 (35-48 PID) まで高値を示した。血清中 E 型肝炎ウイルス抗体は 28-35 PID より検出された (図 1)。

2-4 豚、めん羊および牛の E 型肝炎ウイルス抗体検査とウイルス遺伝子保有調査

75% の肉豚採材時において、120 日齢までに血清中での E 型肝炎ウイルス抗体価の上昇が確認された。一方、6 採材時 (25%) では、ELISA OD 値の上昇は 150-180 日齢まで確認されない、あるいは、150 日齢で初めて確認される結果となった (図 2)。E 型肝炎ウイルス抗体が肥育期末期 (150-180 日齢) の豚で検出された農場において、E 型肝炎ウイルス遺伝子が ELISA OD 値の上昇直前ならびに上昇直後の糞便材料の一部から検出された。母豚血清中 ELISA OD 値は産歴との関連は認められず、高産歴の母豚が高い OD 値を示す例も認められた。一部のめん羊血清は高い ELISA OD 値を示したが、OD 値の分布は一峰性分布を示し (図 3)、OD 値が 1 以上の血清は吸収操作で OD 値の減少がほとんど確認されなかったことから、これらの羊血清が E 型肝炎ウイルス抗体陽性とは判断できなかった (図 4)。また、めん羊肉ならびにレバーから E 型肝炎ウイルス遺伝子は検出されなかった。牛血清の ELISA OD 値は一峰性分布を示し (図 5)、OD 値 0.2 以上を示した血清 15 例中 2 例のみが吸収操作により OD 値の減少が認められた。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 (図 6)。

2-5 豚、めん羊、シカの E 型肝炎ウイルス抗体検査と検査法の検討

熊本県内で捕獲されたイノシシ 118 頭とシカ 59 頭から E 型肝炎ウイルスの検出を試みた結果、シカはすべて陰性、イノシシは 12 頭 (10.2%) が陽性であった。遺伝子型別では、地域特異的に 6 頭ずつ G3 と G4 に分類され、このことは制限酵素

Hha I による切断パターンでも簡易的に鑑別することができた。検体の処理法 (50%PBS 乳剤、ドリップ)、E 型肝炎ウイルス-RNA 抽出法 (AGPC 法、QIAamp viral RNA Mini kit 法) 及び RT-PCR 法の標的 (ORF1、ORF2) を比較検討した結果、50%PBS 乳剤、AGPC 法、ORF2 を標的とした RT-PCR 法の組合せが最も優れていた。

3. ノロウイルス、サポウイルス

3-1 食品等からのウイルス検出法の開発・改良

3-1-1 パンソルビン・トラップ法による食品からの検出

食品を洗滌して得られた液体中にノロウイルスに対して作製された抗血清を添加し、抗原抗体複合体をパンソルビン (黄色ブドウ球菌の菌体) の表面のプロテイン A に吸着させて遠心回収する基本プロトコルを確立した (図 7)。基本プロトコルに様々な改良 (緩衝液の組成・超音波処理・ α -アミラーゼ処理・RNA のカラム精製・特異的プライマーによる逆転写・nested PCR の併用等) を加えることにより、これまで取り扱いが困難であった食品からも効率よくノロウイルスを検出できるようになった (図 8)。Nested PCR を用いた場合の検出限界値としては、焼きそばでウイルス 13 コピー/g 食品、ポテトサラダでウイルス 44 コピー/g 食品であった。

RNA 抽出系として、パンソルビン沈澱を TRIzol-LS (invitrogen) でフェノール抽出した水層にエタノールを加え QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) の QIAamp

カラムで精製する方法を確立した。逆転写反応時にランダムプライマーから NV 特異的なプライマーへ変更することで低レベル汚染検体においても効率のよい検出が可能となった (図 9)。10 種類の汚染モデル食品からの NV 濃縮を試みたところ、PEG 沈澱法と比較しパントラ法は安定した回収効率を示した (図 9)。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、対応する単味血清のみならず、遺伝子群別のプール血清、及び NV プール血清 (19 種) を用いた場合でも、適用可能である (表 1) ことを確認した。

3-1-2 表面汚染推定される食品からの検出法

供試験 18 種類の試験液のうち最も回収率が高かった試験液は SDS Tris-Glycine、次いで 0.1% SDS 加 PBS (-) で、100% 以上の回収率を示し、対照とした PBS (-) は約 60% の回収率であった。高い回収率を示した試験液では、回収率が経時的に増加した。

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) 沈澱は 12% の PEG 濃度 (1M NaCl) が適していた。PEG 沈澱後の沈澱を

SDS-TG で再浮遊することにより、定量値は増加した。

3-1-3 掃除機内ダストからのノロウイルス検出法の検討とノロウイルス、サポウイルスの汚染実態調査

ダストからのノロウイルス回収法について検討し、回収効率が比較的高く、簡便な方法を開発した。すなわち、振出し液として SDS-TG を使い、振出し時間を 1～6 時間とすることで、回収率を約 60～70% とすることができた(表 2、表 3)。PBS(-)を振出し液として用いる従来の方法と比較すると、回収率を 2 倍程度に改善することができた。本法を用い、一般家庭のダスト 51 検体について汚染実態調査を実施したところ、それぞれ 1 検体(2.0%)がノロウイルスあるいはサポウイルス陽性(表 4)であり、その汚染の程度は 10^6 コピー/g を超えるものも存在した(表 5、6)。さらに、ノロウイルス等陽性家庭について継続調査したところ、30 日以上ダストからノロウイルス等が検出された(表 5、6)。

3-2 ノロウイルスと血液型抗原との結合性の解析

糖鎖の僅かな構造の違いがウイルスの結合量を左右した。ノロウイルスが ABO 抗原および Lewis 抗原においてタイプ 1、2 構造の違いを認識していることが明らかになった。

3-3 ノロウイルス、サポウイルスの抗原検出法の開発

3-3-1 ノロウイルス抗原検出法の開発と改良

IC 法は RT-PCR 法と比較して一致率 89.2%、感度 81%、特異性 100%の精度、糞便を用いた場合の検出感度は 1.4×10^4 copy/g 以上であった。市販のトマトジュース、オレンジジュースに 10^7 copy のノロウイルスを加えた検出感度実験では 7.5×10^6 copy/g と低感度の検出率であった。検査の簡便化を試みた結果、綿棒に得た検体をそのまま試薬に挿入し測定に移行する方法に改良し、ベットサイドでの簡単な診断が可能となった。ELISA 改良の結果、RT-PCR 法との一致率は 84.3%→91.2%、感度は 74.5%→85.2%、特異性は 97.6%→100%に向上した。さらにこれまでのキットで検出できない新しい変異株 2008a の VLPs を用いてモノクローナル抗体を作製した。

3-3-2 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

今後のサポウイルスの抗原検出系の開発や、食品などからのサポウイルス濃縮技術開発のため、抗原性が異なる複数のサポウイルス株についてウイルス様中空粒子の作成ならびにそれらに対する特異抗体の作成に成功した。

3-3-3 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

GI/1、GI/5、GII/3、GIV/1 および GV/1 の複数のクローンの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(表 7、図 10)。

株特異的な MAbs、ゲノグループ特異的な MAbs、すべてのサポウイルス-VLPs と反応する MAbs、その他の MAbs を得ることができた。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 11)。さらに、競争 ELISA 法による特異性の確認を行った。これらの MAb を用いてサポウイルスの迅速診断検査の道が開けた (図 12)。

3-4 GII/4 流行株の全ゲノム分析及び構造解析

3-4-1 ゲノム分析

計199株の全ゲノム情報 (約 15×10^5 塩基) を取得した。対象の89% (177/199) が、2006/07期に欧米、香港で流行した新型 GII/4 変異亜株 GII/4 EU-2006b 株であった。この GII/4 EU-2006b 亜株は、2006年1-2月には限局的に国内に存在し (図13)、2007/8~2008/09期も引き続き優勢な亜株として国内に流行したが、流行の規模は縮小した。2007/8から2008/09に4つの単系統群が出現した (図14)。これらの遺伝子構造を解析した結果、直近に流行した亜株間のゲノム組換え体であることが証明された。ゲノム組換え点は、共通して、ORF1とORF2の境界領域に存在した。ゲノム組換えによって、ウイルス複製能、増殖能の変化とウイルス粒子表面の変化を同時に獲得することができる。GII/4亜株間のORF1/2境界領域でのゲノム組換えが頻繁におきており、GII/4の適応進化と流行発生に深く関わっていることが明らかとなった。

3-4-2 構造解析

過去5年間に国内で流行したノロウイルス GII/4 の5つの亜型 (2004/5、2006a、2006b、2007a、2008a) のキャプシド蛋白質に特徴的な残基の P ドメイン二量体構造上での配置を調べた。世界的に大流行した 2006b に特徴的な残基の位置をみると、7つの特徴的な残基のうち6つ (Y352、A356、P357、E372、H378、N412) はキャプシド蛋白質 P ドメイン二量体の外側表面に位置し、1つ (L306) は側面に位置することが明らかになった (図 15)。2004/5、2006a、2007a、2008a では特徴的な残基のうち、それぞれ7つ、2つ、4つ、5つがキャプシド蛋白質二量体の外側表面に位置することが明らかになった。

3-5 ノロウイルスの抗体保有調査

7株のウイルス様粒子に対する愛知県民のノロウイルス抗体保有率を調査した結果、県民全体では GII.4 に対する保有率が最も高かった。

3-6 食品のノロウイルス汚染実態調査

3-6-1 市販生食用カキのノロウイルス汚染実態調査

市販生食用カキは、カキ中腸腺では304個中22個 (7.2%) から、パック水では38検体中5検体 (13.2%) から NV が検出され、パック水に NV の存在が示唆された (図 16)。カキ中腸腺とパック水の両方から NV が検出されたものは3パックあったが、検出 NV の遺伝子型は必ずしも一致しなかった (表 8)。

3-6-2 カキにおけるノロウイルスの量

的分布と推移およびノロウイルス簡易検出法のカキへの応用

ノロウイルス陽性個体におけるノロウイルスの分布は対数正規分布した(図 17)。カキにおけるノロウイルス量の分布を対数正規分布し、かつヒトのノロウイルスに対する感受性は一定であると仮定すると、発症ウイルス量は 37 から 92 コピーと推定された。シーズンにより若干の差があるものの、養殖場(沿岸部)のカキは陽性率およびノロウイルス量ともに 12 月から 1 月にピークとなった(図 18)。先に開発した簡易検出法(福田ら:日本ウイルス学会第 55 回学術集会講演要旨集 p. 388, 2007 年 10 月, 札幌)は RT-seminested PCR 法とほぼ同等の検出感度を示した。

3-6-2 カキからのノロウイルス検出法の改良とカキのノロウイルス、サポウイルス検出状況

破碎法の前処理にアミラーゼ処理を導入することで、ノロウイルス RNA コピー数は増加した(Mann-Whitney の U 検定で有意)。

ノロウイルス同様、サポウイルスもヒトで流行している株が下水やカキからも検出された。

3-7 ノロウイルス・サポウイルス等による食中毒事例の分析

3-7-1 ノロウイルス等の食中毒事例と検査法における問題点

2007 年 4 月~2009 年 11 月の間に島根県でノロウイルスによる食中毒事例を 7 例(内 1 例はサポウイルスとの混合事例)

確認した。サポウイルスとノロウイルスの混合事例においてアサリ中腸腺から検出された両ウイルスの塩基配列は患者から検出したウイルスの塩基配列と同一か極めて類似した。汚染量は両ウイルスともリアルタイム PCR の検出限界値レベルの少量であった。PCR 酵素の種類によって検出効率に差が認められた。また、PCR 増幅産物をクローニングし塩基配列を解析したところ、塩基配列パターン数は PCR 酵素の種類により異なり、配列が一致しない場合があった。

3-7-2 ノロウイルスによる食中毒の発生要因に関する調査

北海道で調査対象の 13 件中 12 件は調理従事者による食品の二次汚染が原因と考えられた事例で、いずれも調理従事者からノロウイルスが検出され、患者から検出されたものと塩基配列が一致した。このうち 9 件の調理従事者は不顕性感染であったが、3 件では原因食品の調理日以前に胃腸炎を発症していた調理従事者からノロウイルスが検出された。また、12 件中 9 件の事例で複数(2~5 名; 20~100%)の調理従事者がノロウイルスに感染していた。二枚貝喫食による食中毒は 2008 年 12 月発生の 1 件のみで、原因食品はカキ酢であった。原材料の同一ロット製品である「パック詰め生食用むき身カキ」からノロウイルスが検出され、パック内のカキのノロウイルス汚染率は 81%、カキ 1 個当たりのノロウイルスコピー数は 675~7,473 であった。

3-7-3 二枚貝の喫食のみられた食中毒事例からの胃腸炎ウイルスの検出

対象とした12事例はすべて、発生当時の検査で患者からノロウイルスが検出された事例であったが、このうち1事例の患者糞便4検体からアストロウイルス遺伝子が検出された。この事例は2004年5月にホテル宿泊客の間で発生した食中毒事例で、原因食品にカキフライが含まれており、中国産の冷凍カキフライが使用されていた。この事例のノロウイルス陽性率は10/15(67%)であり、検出されたノロウイルスの遺伝子型は12種類と、多種にわたっていた。アストロウイルス陽性率は4/15(27%)であり、アストロウイルスが検出された4名の患者は全員、ノロウイルスとの混合感染であった。検出されたアストロウイルス遺伝子の系統樹解析結果から、Type8とType1の2種類の型の関与が確認された。

3-7-4 感染症事例と食中毒事例の判断におけるNV定量検査、遺伝子検査の適用

感染症か食中毒かの判断が困難であった3事例において、患者と調理関係者の糞便中のNVの定量と検出NVの遺伝子解析を行い、以下の結果を得た。事例1:調理従事者から患者と同程度の量のNVが糞便から検出されたが、調理従事者由来NVの遺伝子型(GII.6)は患者由来株(GII.4)とは異なった。事例2:調理関係者から検出されたNVの塩基配列は解析した3領域で患者由来株と完全に一致し、かつ調理従事者から初回採取後7日目に採取された検体から検出されたNVも3領域で完全

に一致した。事例3:調理従事者から少量のNVが検出され、そのNVは患者と同じ遺伝子型に属したが、解析したcapsid領域に1塩基の違いが認められた。各事例の検査結果は、保健所の最終的な疫学調査結果(事例1と3は感染症、事例2は食中毒)と矛盾せず、保健所の疫学調査を裏付けた。

3-7-5 サポウイルスの疫学解析

2005年以降小児科外来患者においては、サポウイルスがノロウイルスに次いで主要な小児急性胃腸炎の原因となっていることが明らかとなった。また、サポウイルスによる集団感染事例が全国で発生していることも明らかとなった。サポウイルスの糞便中への排泄量、期間はノロウイルスと同様、高レベルかつ長期間に及ぶこと、ノロウイルスと同様、症状がないにもかかわらず糞便中に高レベルのサポウイルスが排泄されている無症状感染者が存在することも見いだした。本研究を通じて加熱不十分な貝の摂食によるサポウイルス集団感染事例も初めて見いだした。また、河川水や牡蠣、シジミ、アサリからノロウイルスだけでなくサポウイルスが検出された。

3-8 患者及び下水等からのノロウイルス・サポウイルス検出状況

青森県において、2006/07~2008/09シーズンは、GII/4/281/2006/HK類似株が最も多く検出され、3シーズンにわたって主流となっていたことが明らかとなった(図19)。流行時期では、11月から2月