

201033041A

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

食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究

平成22年度 総括・研究分担報告書

研究代表者 野田 衛

平成23(2011)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

食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究

平成 22 年度 総括・研究分担報告書

研究代表者 野田 衛

平成 23 (2011) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告書

食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究

野田 衛 ----- 3

II. 研究分担報告書

1. 食中毒事例における重感染について

田中 智之 他 ----- 41

2. 食品中のウイルス検査実施に向けてのパンソルビン・トラップ法の汎用化

斎藤 博之 ----- 45

3. ノロウイルス迅速遺伝子型分別システムの開発

鈴木 善幸 他 ----- 59

4. 国内で流行するノロウイルスゲノムの包括的解析

本村 和嗣 ----- 63

5. ノロウイルスカプシド蛋白質の抗原部位・機能部位の新しい解析法の検討

横山 勝 ----- 69

6. ノロウイルス中空粒子および抗血清の作製，ウイルス定量システムの開発

片山 和彦 他 ----- 73

7. バキュロウイルスタンパク質発現系を用いたサポウイルス様中空粒子の作成

岡 智一郎 他 ----- 81

8. 神戸市および長野県で検出された A 型肝炎ウイルスの遺伝子解析

石井 孝司 他 ----- 89

9. Genotype I HEV の細胞培養系樹立およびその安定性の検討

李 天成 ----- 93

III. 研究協力報告書

1. 研究協力者総括報告書

田中 智之 他 ----- 99

2. 二枚貝喫食事例を対象としたノロウイルス以外の腸管系ウイルスの検索

吉澄 志磨 他 ----- 105

3. 食品の関与が推定される集団胃腸炎におけるウイルス検索

森 功次 他 ----- 129

4. カキ関連食中毒事例からの胃腸炎ウイルスの検出および国産食用カキの
ノロウイルス汚染調査

入谷 展弘 他 ----- 135

5. 二枚貝関連食中毒事例からの下痢症ウイルスの検索および疫学解析

吉田 徹也 他 ----- 143

6. 生カキが原因食品と疑われた食中毒疑い事例の患者からの
Aichi Virus の検出

	田村 務 他	-----	153
7.	カキ中の F フェージプラーク測定法の検討		
	阿部 勝彦 他	-----	159
8.	酵素を用いたカキからのノロウイルス濃縮法の検討		
	植木 洋 他	-----	163
9.	非晶性リン酸カルシウム微粒子を用いたウイルス濃縮法の検討 —すし及びサラダ材料からのウイルス回収—		
	篠原 美千代 他	-----	167
10.	下痢症ウイルスの蛍光マルチプレックス RT-PCR 法による検出		
	重本 直樹 他	-----	175
11.	新たに報告されたプライマーによる患者・食品からのサポウイルスの検出		
	飯塚 節子 他	-----	183
12.	サポウイルス VLPs に対する単クローン抗体の解析とその有用性		
	北元 憲利 他	-----	187
13.	愛媛県で検出されたノロウイルスの遺伝子解析		
	山下 育孝 他	-----	195
14.	カキ及び下水における A 型肝炎 (HAV) ・ノロウイルス (NV) 等の 汚染実態調査		
	三上 稔之 他	-----	209
15.	富山県におけるノロウイルス・サポウイルス検出状況		
	小原 真弓 他	-----	221
16.	環境および臨床検体からみたノロウイルス等の下痢症ウイルス流行の解析		
	内野 清子 他	-----	229
17.	汚水処理施設における下痢症ウイルスの動態について		
	高橋 知子 他	-----	235
18.	佐賀県における下水中のウイルス検出状況		
	増本 久人 他	-----	243
19.	食中毒事例から検出されたサポウイルスの遺伝子解析		
	小林 慎一 他	-----	251
20.	ブタ, シカおよびイノシシの E 型肝炎ウイルス保有状況調査		
	原田 誠也 他	-----	255
IV.	研究成果の刊行に関する一覧	-----	261

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

食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究

平成 22 年度 総括研究報告書

研究代表者 野田 衛

平成 23 (2011) 年 3 月

平成 22 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)

「食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究」

総括研究報告書

食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究

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

食品中の病原ウイルスのリスク管理手法の確立を目的として、(1)食品からのウイルス検出法の開発・標準化、(2)ウイルス性食中毒の検査体制の強化、(3)食品、動物、環境の汚染実態調査と分子疫学的研究、(4)食品媒介性ウイルスの疫学的、基礎的研究を実施し、以下の結果を得た。

パンソルビン・トラップ法にガンマグロブリン製剤を用いることで、汎用的な食品検査法を確立した。6種類のノロウイルス(NoV)のVLP、抗血清を作製し、キメラ型NoVに対応した標準DNAおよび標準RNAを作製した。ACP微粒子を用いた食品検査法を開発した。ヒト糞便由来ウイルス汚染指標としてカキ中のFファージ検出法を検討した。新しいサポウイルス(SaV)検出プライマーはアサリからの検出に有用であった。開発したNoV迅速遺伝子型分別システムの有用性を検証した。新たなSaV GI, GII株のVLPの作製に成功した。2010年のHAV2株のほぼ全長の塩基配列を決定した。NoV, SaV, アストロウイルス(AstV)のスクリーニング検査法として蛍光マルチプレックスRT-PCR法を確立した。ブタ626頭中2頭からE型肝炎ウイルス(HEV)を検出した。改良検査法でNoV陽性のカキの多くはリアルタイムRT-PCR法で陽性基準値以上の値を示した。GII.4 2006bは減少傾向を示し、2009/10年流行期は新たに出現したGII.4 2009a亜株が同流行期で34%を占めた。NoV GII.4 2006bカプシド蛋白質の抗原部位や機能部位と予測される部位が明らかになった。NoV GI.4は下水流入水から高頻度に検出されたが、ヒトからの検出は少なかった。SaV, AstV, アイチウイルス(AiV)は臨床検体からの検出率は低かったが、環境検体からは長期に亘り検出された。排水施設および下水処理施設から、NoV, SaV, AiV, エンテロウイルス, アデノウイルス, A群ロタウイルス(HRV), ボカウイルスの多様なウイルスが検出された。GI型HEVの加熱, 次亜塩素酸ナトリウム, UVの不活化条件を明らかにした。非カキ関連事例患者において、NoVの重感染事例を確認した。食中毒事例等について再検査した結果, NoV以外にSaV, AiV, AstV, A群HRVが新たに検出された。NoVとの混合感染時にSaVの増殖が抑えられる可能性が示唆された。地域で散発例由来ウイルスと集団発生由来ウイルスに強い関連性があった。SaVによる患者数655名の大規模食中毒が発生した。

研究分担者		久保 英幸	同上
田中 智之	堺市衛生研究所	吉田 徹也	長野県環境保全研究
斎藤 博之	秋田県健康環境セン		所
	ター	宮坂 たつ子	同上
鈴木 善幸	名古屋市立大学	畔上 由佳	同上
本村 和嗣	国立感染症研究所	内山 友里恵	同上
横山 勝	同上	笠原 ひとみ	同上
片山 和彦	同上	上田 ひろみ	同上
岡 智一郎	同上	長瀬 博	同上
石井 孝司	同上	藤田 暁	同上
李 天成	同上	田村 務	新潟県保健環境科学
			研究所
研究協力者		阿部 勝彦	広島市衛生研究所
内野 清子	堺市衛生研究所	山本 美和子	同上
三好 龍也	同上	田中 寛子	同上
松尾 光子	同上	井澤 麻由	同上
西口 智子	同上	笠間 良雄	同上
吉田 永祥	同上	吉岡 嘉暁	同上
佐藤 裕徳	国立感染症研究所	植木 洋	宮城県保健環境セン
小林 由紀	名古屋市立大学		ター
劉 蘭軍	国立感染症研究所	高橋 由里	同上
吉澄 志磨	北海道立衛生研究所	篠原 美千代	埼玉県衛生研究所
後藤 明子	同上	内田 和江	同上
石田 勢津子	同上	島田 慎一	同上
森 功次	東京都健康安全研究	富岡 恭子	同上
	センター	鈴木 典子	同上
秋場 哲哉	同上	峯岸 俊貴	同上
永野 美由紀	同上	河橋 幸恵	同上
林 志直	同上	重本 直樹	広島県立総合技術研
入谷 展弘	大阪市立環境科学研		究所保健環境センタ
	究所		ー
改田 厚	同上	飯塚 節子	島根県保健環境科学
阿部 仁一郎	同上		研究所
関口 純一郎	同上	北元 憲利	兵庫県立大学

山下 育孝	愛媛県立衛生環境研 究所
青木 紀子	同上
青木 里美	同上
三上 稔之	青森県環境保健セン ター
筒井 理華	同上
吉田 綾子	同上
井上 治	同上
小原 真弓	富山県衛生研究所
岩井 雅恵	同上
小淵 正次	同上
堀元 栄嗣	同上
滝澤 剛則	同上
高橋 知子	岩手県環境保健研究 センター
増本 久人	佐賀県衛生薬業セン ター
南 亮仁	同上
野田 日登美	同上
江口 正宏	同上
原崎 孝子	同上
轟田 清典	同上
船津丸 貞幸	佐賀県食肉衛生検査 所
小林 慎一	愛知県衛生研究所
原田 誠也	熊本県保健環境科学 研究所
西村 浩一	同上
岩切 章	宮崎県日向食肉衛生 検査所
飯島 義雄	神戸市環境保健研究 所
ハンスマン・グ ラント	国立感染症研究所

村上 耕介	同上
上間 匡	国立医薬品食品衛生 研究所

(順不同)

A. 研究目的

食中毒患者の約半数を占めるウイルス性食中毒は国民の食品に由来する健康被害を防止する上で重要な課題である。食中毒の原因食品や汚染経路の特定、食品の汚染実態調査には食品からのウイルス検出法の確立が必須であるが、二枚貝以外の食品検査法は確立されておらず、定量検査の信頼性も確保されていない。また、集団事例を食中毒と判断するための遺伝子型別検査やノロウイルス(NoV)以外の検査はあまり実施されておらず、ウイルス性食中毒の検査体制の強化が求められている。さらに、多くの食品媒介ウイルスは易変異性で、検出ウイルスの動向監視と遺伝子や構造蛋白質の分析に基づく変異型ウイルスに対する診断用抗血清の整備が常に求められる。一方、食品にはヒト以外の動物由来のウイルス汚染の可能性があり、汚染リスクの正確な把握には動物や自然環境におけるウイルスの生態を明らかにする必要がある。また、不顕性感染者や嘔吐物からの食品汚染が推定される事例が報告されており、その実態把握が必要である。

本研究は以下を研究目的とする。

- (1) 食品からのウイルス検出法の開発・標準化：免疫学的手法を導入した高感度検出法の開発。新たなウイルス定量システムの構築。
- (2) ウイルス性食中毒の検査体制の強

化：迅速遺伝子型別システムの構築。食品由来ウイルスの検査法の改良・開発，評価およびマニュアルの作成。診断用抗血清の作成。

(3) 食品，動物，環境の汚染実態調査と分子疫学的研究：食品，人，動物，環境からのウイルスの検出。重要な検出株の全塩基配列の決定と構造解析。

(4) 食品媒介性ウイルスの疫学的，基礎的研究：ノロ以外のウイルスの食中毒原因物質としての意義付けの明確化。食中毒事例等の疫学分析。不活化法の確立。

(5) 以上を総合的に分析し，食品のウイルス管理手法の確立を目指す。

B. 研究方法

1. 食品からのウイルス検出法の開発・標準化

(1) 食品中のウイルス検査実施に向けてのパンソルビン・トラップ法の汎用化

種々の食品からのウイルス検出法の確立を目的として，平成19～21年度に実施された厚生労働科学研究費補助金「食品中のウイルスの制御に関する研究」(H19-食品-一般-016)において開発したパンソルビン・トラップ法を汎用化するため，抗NoV血清，ヒトプール血清(Kojin Bio社，10ロット)，ガンマグロブリン(化血研)，ガンマグロブリン(日本製薬)，Bharglob(Bharat Serum and Vaccine Limited社，10%筋注用ガンマグロブリン製剤(血液ソースは米国)，Advy Chemical社より購入)，Gammagard(米国Baxter社の5%静注用ガンマグロブリン製剤。Alfresa Pharma社より購入)，HAV感染者血清，小児プール血清を用いて，

補足用抗血清としての有用性を検討した。

(2) ノロウイルス検査に必要なウイルス様中空粒子，抗血清の作製およびウイルス定量システムの開発

食品からの高感度なNoV検出法の確立を目的として，NoVを材料として，バキュロウイルスを用いて，ウイルス様中空粒子(VLP)を発現させた。VLPをウサギに免疫し，抗VLP抗血清を作製した。

また，NoV遺伝子検査体制の強化および標準化を目的として，NV68 GI/1およびSaga-1 GII/4 2006b配列にT7 RNA polymerase promoterを付加して合成し，pUC19ベクターに組み込んだ後，大腸菌にトランスフェクションし大量に精製し，濃度測定を行いGI(pT7NV4265-5814)およびGII(pT7Saga4167-5621)用の標準プラスミドDNAを作製した。また，本プラスミドからT7 RNA polymeraseを用いてin vitro合成を行い，標準RNAを得た。

(3) 非晶性リン酸カルシウム微粒子を用いた食品からのウイルス濃縮法の検討

種々の食品からのウイルス検出法の確立を目的として，非晶性リン酸カルシウム(Amorphous calcium phosphate: ACP)微粒子を用いたウイルス濃縮方法(ACP微粒子濃縮法)を検討した。白飯，まぐろの刺身，カットレタス，千切りキャベツ，スライスハムを対象とし，ネコカリシウイルス(FCV)を用いた添加回収実験を行った。

(4) ヒト糞便由来ウイルス汚染指標のためのカキ中のFファージ検出法の検討

カキにおけるNoV等のヒト糞便由来ウイルスの汚染指標としてのFファージの

有用性を検証することを目的として、カキにおける F フェージの測定法を検討した。感染性 F フェージの検出のためのブランク法に加え、ヒト糞便由来 F フェージの同定のための群型別遺伝子検出法を検討した。

(5) カキからのウイルス検出法の改良

カキからのウイルス検出法の高感度化を目的として、カキ 109 個を対象として、中腸腺からのウイルス濃縮効率に及ぼすアミラーゼ (AM)、リパーゼ (LP) およびパンクレリパーゼ (PL) による消化の影響を調べた。また、pH の影響も検討した。

(6) 新たに報告されたサポウイルス検出用プライマーの検討

食品等からの SaV の遺伝子検査の高感度化を目的として、河川水からのサポウイルス (SaV) 検出を目的に新たに設計されたプライマー (Kitajima et al, Appl. Environ. Microbiol 76: 2010) を用いた nested RT-PCR を行い、食品 (アサリ中腸腺) 等からの SaV 検出率を従来法と比較した。

2. ウイルス性食中毒の検査体制の強化

(1) ノロウイルス迅速遺伝子型分別システムの開発

NoV 迅速遺伝子型分別システムの開発を目的として、インフルエンザ A 型ウイルス H1N1 亜型 782 株、H3N2 亜型 1,663 株のゲノム配列を用いて開発方法の有用性を検証した。8 本の分節について系統樹を p distance と近隣結合法を用いて作成し、H1N1, H3N2 それぞれについて 10,000, 000 組の 4 株を抽出し遺伝子組み換えの検出を行った。4 株の組み合わせについて

8 分節の系統樹を p distance と近隣結合法で作成し、ブートストラップリサンプリングで信頼性を評価し、外部枝を全配列の系統樹に重ねて組み換えが起こった系統樹上の位置を推定した。

(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、抗血清、モノクローナル抗体の作成と解析

サポウイルス (SaV) 抗原検出法開発を目的として、各種の SaV を材料として、培養昆虫細胞またはカイコを用いて、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 の存在および形態を確認後、発現させた VLP を抗原として、ウサギおよびモルモットに免疫し、抗血清を得た。VLP およ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 (MAb) 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。

(3) 遺伝子検査法の改良を目指した A 型肝炎ウイルス流行株の遺伝子解析

A 型肝炎ウイルスの高感度遺伝子検査法の確立を目的として、2010 年春季に神戸市および長野県で検出された A 型肝炎ウイルス (HAV) 2 株を対象として、RT-PCR による遺伝子増幅、クローニングを行い、ダイレクトシーケンシングによりゲノムのほぼ全長の塩基配列を決定した。HAV 遺伝子産物 P0 および VP1、ポリメラーゼ領域 3D について系統樹解析を行った。

(4) 食品媒介ウイルスの簡便な同時検出法の開発

種々の食中毒起因ウイルスの簡便な同時検出法の確立を目的として、食中毒事

例等で採取された検体を対象として、蛍光マルチプレックス RT-PCR 法による NoV, SaV, AstV の同時検出法を検討した。

3. 食品、動物、環境の汚染実態調査と分子疫学的研究

(1) ノロウイルス GII.4 流行株の全遺伝子解析と構造解析

NoV流行株の分子疫学的な動向監視を目的として、2006年5月～2010年3月に20の自治体で得られた335株うち277株の GII.4 NoVの全塩基配列を決定し、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。

また、2004年～2009年の NoV GII/4 2006b のカプシド全長のアミノ酸配列 (n = 220) を用いて、NoV GII/4 カプシド蛋白質の抗原部位および機能部位の推定を、1D-3D プロファイル比較法および SNAP (Synonymous Non-synonymous Analysis Program) による同義置換・非同義置換解析を行った。

(2) 食品、動物、環境の汚染実態調査

食品、動物、および下水等の環境における食品媒介ウイルスの汚染リスクを把握するために、NoV, SaV, エンテロウイルス (EV), アデノウイルス (Ad), アイチウイルス (AiV), ロタウイルス (HRV), ポカウイルス (BoV), HAV の検索を実施した (検査対象ウイルス, 検査法等の詳細は、各研究協力報告書参照)。

また、ブタ、イノシシおよびシカ肉の E 型肝炎ウイルス (HEV) の保有状況調査を行った。

4. 食品媒介性ウイルスの疫学的、基礎的研究

(1) E 型肝炎ウイルスの不活化条件の検討

HEV の不活化条件を明らかにするために、遺伝子型 1 (G1), G3 および G4 の HEV を加熱処理 (60°C, 65°C で 5 分, 10 分間), 塩素処理 (62.5ppm～1,000ppm, 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) 食中毒事例の重感染事例の解析

2006年～2009年に発生した 8 集団感染事例, 3 散発事例にカキ喫食歴のない NoV 重感染がみられ, そこから得た 14 検体について全塩基配列解析あるいはカプシド領域の RT-PCR 産物約 280nt の遺伝子解析を行った

(3) 食品媒介事例におけるノロウイルス以外の胃腸炎ウイルスの検索

NoV 以外の胃腸炎起因ウイルスの食品媒介事例への関与を明らかにするために、食品媒介事例を中心として、SaV, AstV, AiV, HRV, EV, BcV, パレコウイルス (PrV) 等の検索を実施した (検査対象ウイルス, 検査法等の詳細は、各研究協力報告書参照)。

(4) 地域における食品媒介事例等の疫学的研究

食品媒介事例の発生要因等を明らかにし、予防対策に資するため、各地域で発

生した食中毒、胃腸炎集団発生、散発例等からウイルス検出、遺伝子解析を行うとともに、その疫学的な実態を把握した。

(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)および「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. 食品からのウイルス検出法の開発・標準化

(1) 食品中のウイルス検査実施に向けてのパンソルビン・トラップ法の汎用化
米国製ガンマグロブリン製剤である「Gammagard」を用いることで、NoV では 11 遺伝子型(GII/2, GII/3, GII/4, GII/5, GII/6, GII/13, GII/18, GI/3, GI/4, GI/8,

GI/9), SaV では 4 種類全ての型, 他に HAV と Ad41 において有効であった。(斎藤研究分担報告書)

(2) ノロウイルス検査に必要なウイルス様中空粒子, 抗血清の作製およびウイルス定量システムの開発

昆虫細胞発現系を用いて新たに GI/13, GII/5, GII/7, GII/4 2006a, 2006b, 2008a の NoV VLP 発現に成功した。また, NoV の遺伝子検査に必須である標準 DNA として, 新しいプラスミド DNA を作製した。逆転写反応とリアルタイム PCR を同一反応系で行う逆転写リアルタイム PCR 法の標準 RNA として, 新たなスタンダード RNA の合成に成功し, 供給体制を整えた(片山研究分担報告書)。

(3) 非晶性リン酸カルシウム微粒子を用いた食品からのウイルス濃縮法の検討

供試したいずれの食品からも効率良くウイルスを回収することができた。キャベツ, レタス, ハムでは 10 g あたり 10^3 コピーの添加ウイルスまでリアルタイム RT-PCR で検出可能であった(篠原研究協力報告書)。

(4) ヒト糞便由来ウイルス汚染指標のためのカキ中の F フェージ検出法の検討

カキからの NoV 検出に利用されるアミラーゼ処理は F フェージのプラーク形成に影響しなかった。カキ 5 検体中 4 検体で 1 個~46 個のプラークが形成された。リアルタイム PCR でのフェージ群別が可能となり, ヒト由来と思われる F フェージがカキから検出された(阿部研究協力報告)。

(5) カキからのウイルス検出法の改良

今回の結果では, 使用した緩衝液の pH

に依存せず、NoV 遺伝子の検出率、検出値 (実測値)共に AM 処理が最も高かった。一方、LP 処理、PL 処理は酵素処理を行わなかった系と比較しても低い検出率を示した (植木研究協力報告書)。

(6) 新たに報告されたサポウイルス検出用プライマーの検討

アサリ中腸腺を対象として 2 つの SaV 遺伝子検出系を比較した結果、検出率は DNase 処理の有無に関わらず、新規法が高かった。DNase 処理による検出率の違いは新規法、従来法とも DNase 未処理の検出率が最も高く、次いで TURBO DNA-free Kit, DNase I (RNase-free) の順であった。一方、患者糞便の場合は両法の結果は完全に一致した (飯塚研究協力報告書)。

2. ウイルス性食中毒の検査体制の強化

(1) ノロウイルス迅速遺伝子型分別システムの開発

8 本の分節の全てのペアにおいて系統樹の樹形に相違が認められ、進化の過程で遺伝子組み換えにおいてつねに連鎖する分節のペアはないことが明らかになった。遺伝子組み換えが検出された 4 株の組み合わせについて、8 本の分節が支持する系統樹の樹形を分類したところ、H1N1 については分節(1, 3, 4, 6)と(2, 5, 7, 8)が異なる樹形を支持することが多かった。H3N2 については分節(1, 2, 3, 5, 6, 7, 8)と(4)が異なる樹形を支持することが多かった (鈴木研究分担報告書)。

(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、抗血清、モノ

クローナル抗体の作成と解析

昆虫細胞発現系を用いて新たに 3 株 (GI Nichinan 株, GII D1711 株, および GII 20082029 株)のサポウイルス VLP 発現に成功した。電子顕微鏡観察により、これら VLP はサポウイルスに特徴的な形態を有していた。また、昆虫細胞を用いた発現系ではサナギ破碎液に SaV VLPs の発現が認められた。一方でカイコ体液には SaV VLPs が認められなかった (岡研究分担報告書)。

新たに得られた MAbs を加えて、その解析と有用性について検討した。GI/1-, GI/5-, GII/2-, GII/3-, GIV/1-および GV/1-VLPs を抗原とした ELISA 法およびウエスタンブロット法で各抗体の反応性を調べたところ、株特異的、遺伝子群特異的、また、すべての遺伝子群に交叉する抗体が得られた。すべての遺伝子群に交叉する抗体 2187 の有用性を臨床材料を用いてイムノクロマト法により検討したが、検出率は低かった (北元研究協力報告書)。

(3) 遺伝子検査法の改良を目指した A 型肝炎ウイルス流行株の遺伝子解析

塩基配列を決定した HAV2 株と、過去に報告されている国内外の 24 株について、一次遺伝子産物である P0 領域について系統解析を行った結果、神戸、長野の 2 株は VP1-2A 領域を用いた系統解析結果と同様に遺伝子型 1A に分類された。カプシド VP1 領域およびポリメラーゼ 3D 領域についても同様に 1A 型に分類された。ゲノム全長について Similarity Plot 解析を行ったところ、2 株ともゲノム全長にわたり 1A と最も高い相同性を示した (石井

研究分担報告書)。

(4) 食品媒介ウイルスの簡便な同時検出法の開発

食中毒・感染症 61 事例の原因ウイルスの検出割合は NoVG1, GII がそれぞれ 10%, 80% で, GI と GII 両方によるものが 7%, SaV が 3% であった。食中毒 14 事例ではすべて NoV に起因した。AiV, PrV, BoV について, 二枚貝関連食中毒 3 事例 10 検体を検査した結果, NoV 以外に 2 事例 3 検体から AiV が検出された(重本研究協力報告書)。

3. 食品, 動物, 環境の汚染実態調査と分子疫学的研究

(1) ノロウイルス GII.4 流行株の全遺伝子解析と構造解析

2006 年～2010 年に得られた 199 株の全塩基配列を決定し, 以下の結果を得た。①GII/4 は異なる 8 種類の亜株に分類された, ②その中でも特定の株(2006b 亜株)が, 4 シーズンにわたって, 日本国内で主流を占めた, ③2009/10 流行期に新しく GII/4 2009a 変異亜株が出現した。④2006b の占有率は年々減少した(本村研究分担報告書)。

1D-3D プロファイルにおける相関係数が -0.20 未満かつ SNAP による同義置換に対する非同義置換の比(dn/ds)が 0 である部位が機能部位の候補と考えられ, それはカプシド突端部, カプシド二量体化の相互作用表面, 近接するドメイン間の境界面, およびカプシド底辺部に見られた(横山研究分担報告書)。

(2) 食品, 動物, 環境の汚染実態調査

① 大阪市で 2010 年 12 月に収去された 9 ロット中 7 ロット(77.8%)から NoV が検出された。カキ 1 個あたりのウイルス量(RNA コピー数)は 80～1, 333 コピーであり, 1 例を除きリアルタイム RT-PCR 法の判定基準値である実測値 10 コピー以上の定量値を示した(入谷研究協力報告書)。

② 青森県において, 2010 年 11 月～12 月に下水処理施設で採取された合流水および分流水 14 検体のうち, 合流水では 7 検体全てから NoV が, 4 検体から SaV が検出され, 分流水では, 7 検体全てから NoV が, 6 検体から SaV が検出された。HAV および AstV 遺伝子はいずれからも検出されなかった。2010 年 11 月～12 月に購入した市販生カキ 12 検体およびパック水 6 検体から NoV, HAV, SaV および AstV は検出されなかった(三上研究協力報告書)。

③ 富山県において 2010 年 1 月～12 月に発生した食中毒, 感染性胃腸炎(集団発生例および小児散発例)から得た糞便, 県西部の下水処理場で同じ期間に採取した下水流入について NoV および SaV の検出を行った。2010 年の NoV は例年と同様に GII.4 が主体であった。NoV GII.4, SaV GI.1 はヒトおよび下水流入水から高頻度で検出された一方, NoV GI.4 は下水流入水では高頻度に検出されるものの, ヒトからはあまり検出されなかった(小原研究協力者報告書)。

④ 堺市において, 2008 年 1 月～2010 年 12 月の散発・集団発生の感染性胃腸炎患者由来臨床検体および下水由来環境検体から NoV 等の検出を行った。当該期間に少なくとも, GI が 6 種類, GII が 7 種類, 計 13 遺伝子型の NoV の浸入・暴露が推測

された。SaV, AstV, AiV は臨床検体からの検出頻度は低かったが、環境検体では長期に亘って検出された(内野研究協力者報告書)。

⑤ 岩手県において、排水施設および下水処理施設から2009年10月～2010年3月、2010年8月～2011年1月に流入水および放流水を採取し、ウイルス検索を行った結果、NoV, SaV, EV, AdV, AiV, A群HRV, BcVの多様なウイルスが検出された(高橋研究協力者報告書)。

⑥ 佐賀県において、1下水処理場で2010年6月～12月に流入水を採取し、ウイルス検索を行った結果、NoV, AstV, AdVが検出され、特にNoV以外ではAstVが多数検出された(増本研究協力報告書)。

⑦ 熊本県による調査で、と畜場に搬入されたブタ626頭のうち2頭からHEVが検出された。今回の調査では、イノシシ並びシカからは検出されなかった(西村研究協力者報告書)。

4. 食品媒介性ウイルスの疫学的、基礎的研究

(1) E型肝炎ウイルスの不活化条件の検討

これまでG3およびG4のHEVの不活化条件を明らかにしてきた。今回新たにG1HEVについても検討した。G1HEVはG3とG4と同様、50uw強度の紫外線照射で30分あるいは125ppm以上の濃度の次亜塩素酸ナトリウムで30分間の処理で不活化する可能性が示唆された。また、アルコール、クロロホルムに抵抗性であった。加熱についてはG3HEVと同様、60℃10分間、65℃5分間以上の処理で不活化した。

血漿存在下加熱処理する場合、ウイルスの不活化効果が影響される(李研究分担報告書)。

(2) 食中毒事例の重感染事例の解析

2006年～2009年に発生した93集団発生事例中、10事例(10.8%)はNoVの重感染事例であり、8事例はカキ非喫食事例であった。8事例11検体のNoV遺伝子型はGI.1/GII.4およびGI.4/GII.4が各4検体、GI.4/GII.2、GI.4/GII.3、GI.8/GII.4が各1検体であった。カキ非喫食集団発生事例に由来する08v534検体はGI.4とGII.3の重感染事例であった。GI.4はGI.4_AB042808Chiba40787JP、に近縁株で、GII.3はShanghai_2009に近縁であった。このGII.3は、ORF1はGII.12、ORF2はGII.3およびORF3はGII.3にそれぞれ近縁の遺伝子からなるキメラ(モザイク)パターンを示した(田中研究分担報告書)

(3) 食品媒介事例におけるノロウイルス以外の胃腸炎ウイルスの検索

① 北海道において2000年7月～2010年12月に発生した二枚貝関連集団胃腸炎42事例中、NoVが40事例、AiVが14事例、SaVが13事例、AstVが3事例、EVが2事例から検出された。また、推定原因食品の二枚貝(原材料)からもAiV, SaV, AstVが検出された。PCR法によるSaV陽性患者糞便33検体では、7検体が糞便1g当たり約 $10^9 \sim 10^{10}$ コピーという高い値を示し、糞便中のSaV量が少なかった26検体中25検体からNV(GII)も検出された(吉澄研究協力報告書)。

② 東京都において、2010年4月～12月に発生した431件の胃腸炎事例のうち、

213 事例(49.4%)にウイルスが関与し、そのうち 195 事例は NoV, 17 事例(8.0%)はその他のウイルスが関与した。NoV 以外のウイルス検出事例のうち、食品媒介が推定される事例は SaV が 2 事例、A 群 HRV が 1 事例であった(森研究協力報告書)。

③ 大阪市において2004年12月以降に発生したカキ関連食中毒 29 事例の患者糞便 74 検体のうち、AiV が 5 事例(17.2%)7 検体(9.5%), SaV が 3 事例(10.3%)3 検体(4.1%)から検出された。複数のウイルスの同時感染事例もみられた(入谷研究協力報告書)。

④ 長野県において 2006 年～2010 年に発生した二枚貝(カキ)関連食中毒 4 事例のうち、患者等糞便 35 検体から NoV 以外に SaV(17.1%), AiV(14.3%)が、原因食品として疑われた加熱調理用カキの同一ロット品 10 検体から NoV 以外に、AiV(4/10)および AstV(4/10)が検出された(吉田研究協力報告書)。

⑤ 新潟県において、2008 年～2010 年 3 月に発生した生カキ関連食中毒事例 7 例の患者便等 34 検体のうち、7 事例中 2 事例、34 検体中 3 検体から AiV が検出した。同事例から NoV, SaV, AstV は検出されなかった(田村研究報告書)。

(4) 地域における食品媒介事例等の疫学的研究

① 愛媛県で 2010 年 1 月～12 月に、散发例および集団発生例から検出された NoV について分子疫学的解析を行った結果、地域社会での NoV の流行が食中毒や胃腸炎集団発生と密接な関係を持っていることが示唆された。1 月～6 月に最も多く検出された GII.4 は、約 55%が 2006b であ

ったが、約 45%は、2008a および新たな変異株である NewOrleans2009 タイプであった。GII.3 はすべてポリメラーゼ領域が SaitamaU1/97/JP と高い相同性を示す組換えウイルスで、GII.2 は組換えウイルスと組換えのないウイルスの 2 種類が検出された(山下研究協力報告書)。

② 2010 年 1 月、愛知県、三重県、岐阜県で給食弁当を原因食とする食中毒事例が発生した。喫食者 3, 827 名中 655 名(17.1%)が胃腸炎症状を呈し、有症者と原因施設の従事者から SaV が検出され、有症者と従事者由来の SaV は互いに高い相同性を示し、GI.2 に分類された(小林研究協力報告書)。

D. 考察

1. 食品からのウイルス検出法の開発・標準化

(1) 食品中のウイルス検査実施に向けてのパンソルビン・トラップ法の汎用化

平成 19～21 年度厚生労働科学研究費補助金「食品中のウイルスの制御に関する研究」(H19-食品-一般-016)において一般的な食品から NoV を検出する手法としてパンソルビン・トラップ法(パントラ法)を開発した。本法の汎用化には、汎用的な抗体供給源を確保する必要があったが、「Gammagard」を用いることで、NoV(11 遺伝子型)、サポウイルス(全遺伝子型 4 種類)、A 型肝炎ウイルス、アデノウイルス 41 型において有効性を確認した。これにより、ガンマグロブリン製剤を常用試薬として準備しておけば、一通りの下痢症ウイルス検査が可能となることがわかった。一方で、患者の回復期血清を利用

することで限定的な局面における流行事例に対応できることが示唆された。このことは、流通食品が汚染された場合などに原因を突き止めて、必要に応じて回収命令を出すなどの対応を可能にするものと考えられた。

(2) ノロウイルス検査に必要なウイルス様中空粒子、抗血清の作製およびウイルス定量システムの開発

昆虫細胞発現系を用いて新たに6種類のNoVのVLP、抗血清を作製した。これで約80%の遺伝子型のNoVへの対応を終えた。これらの抗体を用いることにより、種々のNoVを食品等から検出(濃縮)することが可能となる。今後、残る20%のNoVについて対応する予定である。

新たに作製した標準プラスミドは、RdRp領域からカプシドN/S領域に至る約1600塩基をカバーする。本プラスミドを用いることで、リアルタイムRT-PCRはもちろん、分子疫学におけるHuNoVキメリズム解析にも用いることが可能となった。標準RNAは、RT-PCR反応における逆転写行程をモニターすることが可能であり、新たなスタンダードとして期待できる。

(3) 非晶性リン酸カルシウム微粒子を用いた食品からのウイルス濃縮法の検討

新たに構築したACP微粒子濃縮法を用いることにより、キャベツ、レタス、ハム、マグロの刺身および白飯からウイルスを効率よく濃縮できることが判明した。遺伝子増幅反応阻害物質が多いと報告されているレタスについても検出が可能であった。ハムではアスコルビン酸の添加によりウイルスを高率に回収でき、刺身ではACP微粒子と食品を同時に攪拌する

ことにより、回収率が改善した。今後、本法を種々の食品に応用し、適用可能な食品群を検討していく。

(4) ヒト糞便由来ウイルス汚染指標のためのカキ中のFファージ検出法の検討

NoV等の食品媒介ウイルスの多くは培養が不可能か困難で、その検出は遺伝子検査に頼らざるを得ない。しかし、遺伝子検査では必ずしも感染性ウイルスを検出する訳ではなく、そのため食品の汚染リスクを正確に把握できない。また、カキを媒介食品とするウイルスはNoVだけでなく、HAV、SaVなど様々である。そのため、ヒト糞便に由来する感染性をもつ種々のウイルスの汚染を把握する新たな手法が求められている。本研究は、ヒト糞便由来ウイルス汚染指標としてのFファージの有用性を検証することを目標としている。今年度の研究で、感染性ファージ検出のためのプラーク測定法およびヒト糞便由来ファージ同定のためのリアルタイムPCR法を検討した。カキから検出されるプラーク数が少ないため今後濃縮操作等を検討し、感度を向上させる必要がある。

(5) カキからのウイルス検出法の改良

今回の結果ではAM処理とPEG沈澱法を組み合わせた方法が検出率、定量値とも高い値を示した。AM処理とLP処理およびPL処理の間に、顕著な検出率の差が出た原因については不明であり、今後これらの原因を解明し、検出感度の向上に繋げたい。

アミラーゼ処理に加え、RNA抽出、DNase処理およびcDNAの作製において有用とされる方法を導入して検査を実施したとこ

ろ、1ロットを除いたすべての陽性検体でリアルタイムRT-PCRの陽性判定基準値を超え、カキからの検査に有用であった。

(6) 新たに報告されたサポウイルス検出用プライマーの検討

アサリ中腸腺を対象としたところ、新たなプライマーセットを用いる新規法が、従来法より高い SaV 検出率を示した。食用貝などを対象とした場合は、新規法を用いることで、より高精度に SaV を検出できる可能性がある。

2. ウイルス性食中毒の検査体制の強化

(1) ノロウイルス迅速遺伝子型分別システムの開発

開発法によりインフルエンザ A 型ウイルスにおいて遺伝子組み換えが起こったことならびにその系統樹上での位置を信頼性良く推定できることが分かった。今後は、この方法を NoV の遺伝子組み換え検出に応用し、遺伝子型分類システムの開発に役立てたい。

(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、抗血清、モノクローナル抗体の作成と解析

新たな SaV GI, GII 株について VLP を作成することに成功した。NoV の場合、VLP パネルの蓄積、継続的な抗体取得、評価に 10 年以上の年月を要した。SaV も、継続的な VLP 発現、抗体作成の取り組みによって、食品や臨床検体に対する実用的な SaV 抗原検出系の開発が進むことが期待される。

すべての遺伝子群に交叉する抗体を用いて臨床材料でイムノクロマト法により

検討したが、検出率は低かった。今後、遺伝子群特異的な抗体を混合して用いる方法も検討する必要がある。また、新たな抗体を作製し、SaV 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役立てたい。

(3) 遺伝子検査法の改良を目指した A 型肝炎ウイルス流行株の遺伝子解析

現在の HAV の遺伝子検査法は感度が必ずしも十分ではない。今回新たに得られた神戸市、長野県の 2 株のゲノム情報をもとに、新たに HAV 検出用のプライマーの設計について検討し、高感度検出系の構築に繋げる予定である。

(4) 食品媒介ウイルスの簡便な同時検出法の開発

NoV, SaV, AstV のスクリーニング検査法として蛍光マルチプレックス RT-PCR 法を確立した。本法では、PCR 産物のサイズ以外にプライマーに標識した 4 色の蛍光で PCR 産物を色分けし、目視により容易に検出ウイルス遺伝子を判別できる。この方法により食中毒等の事例の原因ウイルスを特定することが可能であった。

3. 食品、動物、環境の汚染実態調査と分子疫学的研究

(1) ノロウイルス GII.4 流行株の全遺伝子解析と構造解析

2006/07年以降主流であった 2006b は過去 4 シーズンにわたりヒト集団内で大流行したため、集団免疫による淘汰を受けている可能性がある。本年度以降に、主要流行株の遺伝子型、あるいは遺伝子亜型の置換がおこる可能性がある。2009/10

流行期に新しく出現した2009a亜株は同期に33.7% (26/77)を占めた。特徴的なアミノ酸置換は5箇所、カプシドP2の変異は1箇所のみで、抗原変異による集団免疫からの逃避以外に別の選択的優位性が存在するのかもしれない。

カプシド突端部は血液型抗原結合部位周辺であり、受容体との結合に必要な役割を持つ部位と考えられる。カプシド二量体化の相互作用表面に検出された部位は二量体形成に必要な役割を、近接するドメイン間の境界面に検出された部位はドメインの配置の安定性に必要な役割を持ち、どちらも機能維持に必要な部位であると考えられる。カプシド底辺部に検出された部位はウイルス粒子内部に位置するため、現時点ではその役割は不明である。

(2) 食品、動物、環境の汚染実態調査

大阪市の調査で、2010年12月初旬のみに市販されていた生食用カキから高率にNoVが検出されたことから、今後もNoV食中毒の感染源として十分な注意が必要であると考えられた。

青森県の調査で、合流水および分流水からNoV, SaVを高率に検出し、その遺伝子型を確認した。ウイルス性食中毒や感染症のリスク評価に繋がるものと考えられる。

富山県の調査で、NoV GII.4, SaV GI.1はヒトおよび下水流入水から高頻度で検出された一方、NoV GI.4は下水流入水から高頻度に検出されたが、ヒトからの検出は少なかった。このことは、NoVの遺伝子型により不顕性感染の起こしやすさ等、病原性の違いがある可能性を示唆する。

堺市の調査で、SaV, AstV, AiVは臨床検体からの検出頻度は低かったが、環境検体では長期に亘って検出されたことから、感染性胃腸炎として表面化しないウイルスの浸淫があることが示唆された。胃腸炎起因ウイルスの疫学の全体像把握には臨床と環境の両面からの調査が必要である。

岩手県の調査で、下水から、NoV, SaV, EV, AdV, AiV, A群HRV, BcVの多様なウイルスが検出された。今後は、定量的な調査が必要である。

佐賀県の調査でAstVが多く検出された。AstVの病原性について今後患者の病原体サーベイランスの結果と併せて検討する必要がある。

と畜場で処理されるブタの血液からHEV遺伝子が検出されたことから、ブタの内臓以外の部位もHEVに汚染されている可能性があることが推察された。過去に熊本県でイノシシから検出されたHEVとは遺伝子が異なったことから、イノシシとブタでは遺伝的に異なるHEVが浸淫している可能性がある。

4. 食品媒介性ウイルスの疫学的、基礎的研究

(1) E型肝炎ウイルスの不活化条件の検討

遺伝子型が異なるG1, G3およびG4 HEVの培養細胞系を確立した。本研究から得られたHEVの不活化条件に関する情報はHEVによる感染症や食中毒防止対策の有力な科学根拠となる。遺伝子型やウイルスと共存する物質などによってウイルスの安定性が異なることから、HEVを不活

化するときにこれらの要素を考慮する必要がある。

(2) 食中毒事例の重感染事例の解析

NoV の GI と GII の間の重感染の頻度はそれほど高くない。今回、カキ非関連事例において重感染事例を明らかにした。カキ喫食に関与しない重感染の生じるメカニズムは不明であり、疫学的研究課題である。重感染は遺伝子組み換えを起こす可能性が高く、その結果 NV の急速な構造や機能的変化を生じる可能性があり、今後詳細な検討が必要である。

(3) 食品媒介事例におけるノロウイルス以外の胃腸炎ウイルスの検索

食中毒の原因調査においては NoV 以外のウイルスは検査されない場合が多いことから、それらのウイルスの食品媒介事例への関与およびその割合は不明である。今回過去に発生した食中毒事例等について再検査した結果、NoV 以外に SaV, AiV, AstV, A 群 HRV が新たに検出された。多くの事例は、NoV 等との混合検出でありノロウイルス以外のウイルスの病原性は不明な部分があり、事実、SaV, AstV, AiV は臨床検体からの検出頻度は低かったが、環境検体では長期に亘って検出された。これらのことから、SaV, AstV, AiV は不顕性感染を起こしやすいことも考えられる。一方、これらのウイルスの単独検出事例もあり、それらが食品媒介事例の原因であった可能性が示唆される。今後さらなる調査が必要である。糞便中の SaV 量が少なかった検体の多くから NV (GII) も検出され、NV (GII) との混合感染時には SaV の増殖が抑えられる可能性が示唆さ

れた。

(4) 地域における食品媒介事例等の疫学的研究

地域で散発例から検出されるウイルスとカキ等二枚貝が関連しない集団発生の原因ウイルスに強い関連性があった。地域の流行ウイルスが、調理従事者等を介して調理中の食品を 2 次汚染し、食中毒の原因となり、また、学校、病院および老人福祉施設等に持ち込まれて、施設内においてヒト-ヒト感染で集団発生を引き起こしていることを示唆する。

患者数 600 名を超える給食弁当を原因とする大規模な食中毒事件が SaV によることを明にした。SaV も NoV と同様に大規模食中毒の病因物質となることが示唆されたことから、食品取り扱い者に対する注意喚起が必要と考えられた。

E. 結論

1. 食品からのウイルス検出法の開発・標準化

(1) 食品中のウイルス検査実施に向けてのパンソルビン・トラップ法の汎用化

- パンソルビン・トラップ法にガンマグロブリン製剤を用いることで、汎用化が可能となった。
- 新たに 6 種類の NoV の VLP, 抗血清を作製した。キメラ型 NoV に対応した標準 DNA および標準 RNA を作製した。
- 新たな食品中のウイルス検出法として ACP 微粒子を用いた濃縮法を開発した。
- ヒト糞便由来ウイルス汚染指標のためのカキ中の F フェージ検出法の検