

高木弘隆，遠矢幸伸，片山和彦，岡智一郎，杉山和良 マウスノロウイルス(MNV)のエタノール感受性と粒子，遺伝子への影響についての検討 第 57 回日本ウイルス学会学術集会，東京，2009 年 10 月 25～27 日。

高木弘隆，北島正章，遠矢幸伸，岡智一郎，片山浩之，片山和彦，杉山和良．マウスノロウイルス(MNV)のマウス由来培養細胞での増殖性についての検討．第 58 回日本ウイルス学会学術集会，2010 年 11 月 7 日～9 日，徳島

高橋知子，高橋朱実，高橋雅輝，蛇口哲夫．下水処理におけるノロウイルスの挙動について．第 44 回日本水環境学会．福岡市，2010 年 3 月

高橋知子，高橋雅輝，高橋朱実，齋藤幸一，蛇口哲夫．水系における NV の挙動とリスク低減に関する研究．第 63 回日本細菌学会．東北支部総会，盛岡市，2009 年 8 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 研究分担報告書

田中 智之
齋藤 博之
鈴木 善幸
本村 和嗣
横山 勝
片山 和彦
岡 智一郎
石井 孝司
李 天成

平成 23 (2011) 年 3 月

食中毒事例における重感染について

研究分担者	田中智之	堺市衛生研究所
研究協力者	田村 務	新潟県保健環境科学研究所
	本村和嗣	国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター
	佐藤裕徳	国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター
	内野清子	堺市衛生研究所
	三好龍也	堺市衛生研究所
	松尾光子	堺市衛生研究所
	西口智子	堺市衛生研究所
	吉田永祥	堺市衛生研究所

研究要旨

ノロウイルス(NV)は感染性急性胃腸炎原因微生物のトップリーダーである。NVの環境での安定性に加えて遺伝子変異が大きな要因として考えられている。多数の遺伝子型が検出されるカキ関連NV以外に、カキ非関連NV集団発生事例から検出されたNV遺伝子の解析を試みた。その結果、集団感染事例の一検体にNVポリメラーゼ領域 GII.12 とカプシド領域 GII.3 のリキメラ(リコンビナント)ウイルスが検出された。さらに GI.4 の重感染も認められた。幸いこのキメラウイルスによる感染性胃腸炎の大きな流行の報告はないが、今後流行の可能性があり十分なサーベイランスが重要と考えられた。

A. 研究目的

ノロウイルス(NV)は感染性胃腸炎の主たる原因微生物である。感染経路は二枚貝や汚染食材に起因するが多い。さらにヒト-ヒト接触感染、塵埃感染など多岐にわたっている。流行規模は大きく集団発生、施設内感染などがある。大規模な感染様式はNVの環境における安定性を維持ことによる総合的な感染力の強さのみならずNV自身の遺伝子変異による感

染力の増強が大きな要因と考えられる。カキ関連NV食中毒では、カキの生活様式から多くのNV遺伝子型が検出される。しかし、カキ非関連NV感染症から検出される遺伝子型は単一であることが多い。カキ非関連NV食中毒事例における複数の遺伝子型の解析を試みることは、NVス遺伝子変異等のメカニズムを解く上で重要な研究課題と考える。カキ喫食歴のないNV食中毒事例につい

て、一患者から複数の遺伝子型の検出される頻度、NV の遺伝子変異の有無について解析し、流行予測や予防に寄することを研究目的とした。

B. 研究方法

1. 材料

2006～2009 にかけて、8 集団感染事例、3 散発事例にカキ喫食歴のない NV 重感染が認められた。14 検体を得られ、そのうち 5 検体は全塩基配列解析を行い、残りの検体は capsid 領域の RT-PCR 産物約 280nt の遺伝子解析を行った (Kageyama, T. et al.; 2004, J Clin Microbiol 42)。

2. 方法

本邦におけるノロウイルスサーベイランスデータは下記の HP から収集した (<http://idsc.nih.go.jp/iasr/index.html>) また、近畿地方におけるノロウイルスサーベイランス情報は平成 22 年度地研近畿支部ウイルス部会資料から借用した。遺伝子系統樹は Neighbor-joining trees にて作成した (Motomura K et al., J. Virol. 84:2010)。

(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

- 1) 2009 年における近畿ブロックでの NV 混合感染事例は食中毒関連事例で 1.4%、非関連事例で 4.3% であった。
- 2) 2006 年から 2009 年にかけて、堺市での NV 重感染事例は 93 集団発生事例中、10 事例 (10.8%) あり、8 事例はカキ

非喫食事例であった。

- 3) 8 事例 11 検体のノロウイルス遺伝子型は 4 検体 GI. 1/GII. 4, 4 検体 GI. 4/GII. 4, 各 1 検体が GI. 4/GII. 2, GI. 4/GII. 3, GI. 8/GII. 4 であった。

散発 3 事例は、GI. 3/GII. 4, GI. 4/GII. 3, GI. 1/GII. 4 であった。

- 4) 08v534 検体はカキ非喫食集団発生事例であるが、ノロウイルス遺伝子型は GI. 4/GII. 3 の重感染であった。しかし、GI. 4 は GI. 4_AB042808Chiba40787_{JP} に近縁株であった。一方 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。リコンビナントポイントは、報告されているその他のリコンビナントウイルス同様に ORF1 と ORF2 境界領域であった。

D. 考察

NVGI, GII 間の重感染の頻度はそれほど高くない。特に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、今後の疫学的研究課題である。加えて Genogroup 内での重感染の生じる可能性とその場合の遺伝子解析も重要な研究課題である。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 structural and biological phenotypes の変化が生じる可能性を高め、生き延びるために大きな流行に繋がらせる可能性を提供する。インフルエンザウイルスのように RNA ウイルスである NV が自然淘汰

あるいは免疫淘汰から逃れる一つの術かもしれない。

特に我々の重感染事例から検出した遺伝子組み換え株、08v534_GII.3 は、幸いにも地域での浸淫やNV大流行の報告はない。しかし、今年度はGII.3は主流株の様相を呈しておりサーベイランス強化や molecular surveillance は、新しいNV変異株を検出する手段として有用と考える。これまで我々は類似のNVリコンビナント株を報告した。この株 Sakai はNV感染死亡事例から検出されたものであるが、直接死亡原因としての確証には至っていない。しかし、このようなNV遺伝子学的調査研究はNV流行予測や感染拡大性、病因的役割の解析に果たす新しいツールとして大いに役立つものと思われる。

〈追加報告〉 昨年度の本研究班で構築されたノロウイルス検出 IC 法では NV2008a 株 3 検体の反応性の低いことを報告し、NV2008a VLPs の作製と共にモノクローナル抗体を作製し、IC法の補足抗体のカクテル化による改良がスチートしたことを報告した。しかし、その後多くの 2008a 糞便検体で再検査を行ったところ、現在の IC 法で GII.4 2008a 株 6 / 8 検体で陽性、GII.4 New Orleans 株 4 / 4 検体の陽性率を得た。糞便中の阻害物質の有無については詳細に検討されていないが、何らかの因子の影響によるものと考えられた。

E. 結論

疫学的調査でカキ喫食歴のない集団NV感

染事例からNV重感染例の遺伝子学的解析を試みた。一人の患者からGI.4/GII.3のNV遺伝子が検出された。GII.3は、ポリメラーゼ領域のORF1はGII.12の遺伝子型を示し、カプシト領域のORF2およびORF3はGII.3にそれぞれ近縁の遺伝子をもつキメラ(リコンビナント)株であった。

このようなNV変異株の解析は、今後のNV流行予測に大きく寄与するものと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) Kazushi Motomura, Masaru Yokoyama, Hirotaka Ode, Hiromi Nakamura, Hiromi Mori¹, Tadahito Kanda, Tomoichiro Oka, Kazuhiko Katayama, Mamoru Noda, Tomoyuki Tanaka, Naokazu Takeda, Hironori Sat^{1*}, and the Norovirus Surveillance Group of Japan

Divergent Evolution of Norovirus GII/4 by Genome Recombination over 2006-2009 in Japan. *J.Virol.* 2010.

(2) Yasutaka Yamashita, Yuka Ootsuka, Meiko Kondo, Mitsuaki Oseto, Mitsunori Doi, Takeshi Miyamoto, Tetsuroo Ueda, Hirokazu Kondo, Tomoyuki Tanaka, Takaji Wakita, Kazuhiko Katayama, Naokazu Takeda, and Tomoichiro Oka. Molecular Characterization of Sapovirus Detected in a Gastroenteritis Outbreak at a Wedding Hall. *J.Med.Virol.* 2010, 82:720-726

(3) 田中智之. 院内感染予防におけるノロウイルス迅速診断法の活用
感染対策 ICT ジャーナル. 2010.5(4), 427-433

(4) 田中智之. ノロウイルス食中毒.
食品微生物学辞典. 中央法規出版株式会社.
P188-189, 2010年4月1日発行

2. 学会発表

なし

G. 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

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」
研究分担報告書

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

研究分担者 齋藤博之 秋田県健康環境センター・保健衛生部

研究要旨

前年度まで実施された厚生労働科学研究事業において、ノロウイルス GII/4 型とそれに対するウサギ抗血清を用いた汚染回収モデルにより、固形・液状・練り物・油物など、どのような食品でもウイルス検査ができる、パンソルビン・トラップ法を開発した。今年度からの研究事業では、下痢症ウイルス全般に対応した方法とするため、添加する抗体について検討を加えた。その結果、外国製ガンマグロブリン製剤である「Gammagard」を用いることで、ノロウイルスでは 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)、サポウイルスでは 4 種類全ての型、他に A 型肝炎とアデノウイルス 41 型において有効であることを確認した。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。

A. 研究目的

ウイルス性食中毒の対策として二枚貝の汚染実態調査や、調理従事者への衛生教育等が進められてきている。しかしながら、原因として疑われる食品からのウイルス検出は、その作業の困難さからこれまでほとんど検討されてこなかったため、具体的な汚染ルートの解明に決め手を欠いているのが実状である。原因物質としてはノロウイルス(NoV)が大部分を占めているが、他にもサポウイルス(SaV)やアデノウイルス 41 型(Ad41)に代表される腸管系アデノウイルスも含まれている。さらに、2010 年 3 月に我が国における A

型肝炎(HAV)感染者の報告が急増するなど、食品中のウイルスを検出する方法の確立は急務となっている。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、固形、液状、練り物、油物などの一般的な食品から 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、この問題を解決するための糸口を見出すことができた。これまでにパントラ法の基本プロトコルはほぼ完成したが、食品検体の処理方法を優先的に検討したため、ウイルスの種類としては流行の主

流である NoV-GII/4 型にターゲットを絞って開発を進めてきた。しかしながら、現実問題として NoV にも多くの型が存在し、さらに NoV 以外の下痢症ウイルスへの対応が課題として残っている。また、これまでの開発に用いてきたウイルス様中空粒子 (VLP) で作製したウサギ抗血清は、量的な問題があるため、全国的な食中毒事例対応のためには、より汎用的な抗体供給源を確保する必要があった。本研究では、こうした問題を解決するために次の検討を行った。

- ①感染者 (ヒト) の血清の利用。
- ②試薬として市販されているヒトプール血清の利用。
- ③医薬品として市販されているガンマグロブリン製剤の利用。
- ④上記の抗体供給源を利用した広範な下痢症ウイルスへの対応。

B. 研究方法

1. 研究材料

汚染実験に用いる食品として、市販されているポテトサラダと焼きソバを用いた。また、検出対象となるウイルスとして、NoV-GII/2、GII/3、GII/4、GII/5、GII/6、GII/13、GII/18、GI/3、GI/4、GI/8、GI/9、SaV-GI、GII、GIV、GV、及び Ad41 については秋田県内の集団感染事例とサーベイランス定点から得られた糞便を用いた。NoV は篠原らのプライマー G2-SKF/G2-SKR、及び G1-SKF/G1-SKR (第 48 回に本ウイルス学会学術集会抄録、P264、2000) で増幅した PCR 産物を系統樹解析することにより血清型を確認した。同様に SaV の血清型は、Okada らのプライマー SV-F2/SV-R2 (Arch Virol 147, 1445-1451, 2002)、Ad41 につ

いては Saitoh-Inagawa W らのプライマー AdU-S/AdU-A (J Clin Microbiol 34, 2113-2116, 1996) を用いて得られた PCR 産物の系統樹解析により確認した。HAV については、市販の不活化ワクチン「エイムゲン」(化血研) を用いた。

2. 試薬類

1) 抗 NoV 血清

国立感染症研究所で VLP から作製したウサギ免疫血清 (抗 GI/3, 4, 8 GII/2, 3, 4, 5, 6) を単味で用いた。

2) ヒトプール血清

Kojin Bio 社より別ロットで 10 種類を購入した。

3) ガンマグロブリン (化血研)

15% 筋注用医薬品を Alfresa Pharma 社より購入した。

4) ガンマグロブリン (日本製薬)

15% 筋注用医薬品を Alfresa Pharma 社より購入した。

5) Bharglob

インド Bharat Serum and Vaccine Limited 社の 10% 筋注用ガンマグロブリン製剤 (血液ソースは米国)。Advy Chemical 社より購入した。

6) Gammagard

米国 Baxter 社の 5% 静注用ガンマグロブリン製剤。Alfresa Pharma 社より購入した。

7) HAV 感染者血清

1957 年に秋田県尾去沢で発生した HAV 集団感染事例 (日本小児科学雑誌 63, 37-42, 1959) で採取・保管されていた血清。須藤恒久・秋田大学名誉教授より分与いただいた。

8) 小児プール血清

感染症流行予測調査で採取した、10歳以下の小児の血清 20人分を無作為にプールしたものをを用いた。

9) 食品洗滌液

Tris-HCl (pH8.4) - 0.5M NaCl · 0.1% Tween20

10) パンソルビン

黄色ブドウ球菌を熱処理してホルマリン固定したものの懸濁液で、メルク社から購入した。

11) フェノール系 RNA 抽出キット

TRIzol-LS (invitrogen)を使用した。

12) カラム方式の RNA 抽出キット

QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen)を使用した。

13) 再懸濁液

11)の抽出キット添付の ALV 液を用いた。

14) 逆転写反応エンハンサー

RTmate (ニッポンジーン)を使用した。

15) DNase I (RT Grade) 及び RNase inhibitor

ニッポンジーンの製品を使用した。

16) アミラーゼ

前処理用: 枯草菌由来 α -Amylase 粉末 (和光純薬)を使用した。

後処理用: α -Amylase Ultrapure (ニッポンジーン)を使用した。

17) 食品処理袋

サニスペックテストバッグ (アズワン)を使用した。

3. パンソルビン・トラップ法の全体の手順

基本的な操作の流れを図 1 に示した。なお、ウイルスと抗体の反応性を確認するための試験 (図 2A、表 1~5) では、超音波処理と α -Amyrase 前処理は省略した。

4. ウイルスの検出

Ad41 については図 1 の抽出液をそのまま用い、Real-time PCR 検出系 (J Clin Microbiol 44, 3189-3195, 2006) でコピー数を測定した。NoV、SaV、及び HAV については、図 1 で得られた抽出液 (60 μ L) から 8.5 μ L を取り、DNase I 及び α -Amylase Ultrapure を各 1 μ L、RNase inhibitor を 0.25 μ L、5 \times 逆転写 buffer (添付) を 4 μ L 加えた後、蒸留水で反応量を 15.5 μ L とし、37 $^{\circ}$ C 10 分、65 $^{\circ}$ C 5 分のインキュベーションを行った。その後、各ウイルス特異的プライマー (Real-time PCR と同一のもの)、dNTP、RTmate、及び逆転写酵素を追加して cDNA を合成した (反応容量 20 μ L)。合成した cDNA 溶液を 5 μ L 取り、NoV については Kageyama ら (J Clin Microbiol, 41, 1548-1557, 2003)、SaV については Oka ら (J Med Virol 78, 1347-1353, 2006)、HAV については、国立感染症研究所病原体検出マニュアル (A 型肝炎、平成 18 年 8 月版) の Real-time PCR によりウイルスを検出した。使用した機器はロシュ製「LightCycler 350S」、及び「LightCycler 480」で反応容量は 20 μ L である。

C. 研究結果

1. NoV 回収におけるヒトプール血清の利用

ヒトプール血清は、10~20 人程度の成人血清を混合して研究用試薬として販売されている。血液の由来は米国である。成人血清は、幼少期からの感染経験を経てさまざまなウイルスに対する抗体を含んでいるものと考えられるため、パントラ法の抗体供給源として最初に検討した。図 2A にはヒトプール

血清の添加量によるウイルス回収効率の変化を示した。50mL の反応系に対して、ヒトプール血清を 5mL 添加した場合は、無添加の場合と同じになり全く効果が認められなかった。最適添加量は0.5mLで、VLPで作製したウサギ抗血清に準ずる回収率が得られた。以後、ヒト血清(プール血清、または感染者血清)を用いる場合には0.5mLを添加することとした。

図 2B と図 2C には、焼きそばとポテトサラダの汚染検体から、NoV-GII/4 型の回収を試みた結果を示した。ヒトプール血清0.5mLを添加することでウサギ抗血清に匹敵する増幅曲線が得られた。

一方で、ヒトプール血清のロット間の差を検証するために、10 種類の別ロットによる回収率を比較したものが表 1 である。HS は感染歴のある個人の糞便と血清を採取したもので、参考として表に加えた。回収率の便宜上の評価基準として 10%以上(白:積極的に使用する価値あり)、1~9%(灰色:使用できるが他の方法も考慮に入れる)、0.9%以下(黒:50mL の食品乳剤から、0.5mL をサンプリングしたのと同じため使用する意味が無い)の三段階に分けて表記した。NoV の流行の主流を占めているNoV-GII/4 型の場合にはロット間の差はあまり認められないが、それ以外の型、特に GI 型になるとバラつきが大きくなり、回収率の数値も低くなった。

2. 食品中の HAV の検出

2010年3月にHAV感染者の報告数が急増したことを受けて、パントラ法によって食品からのHAV検出が可能かどうかを検討した。汚染モデル食品として焼きそば(図 3A)とポテトサラダ(図 3C)をHAV不活化ワクチンで

汚染させたものを用いた。添加抗体は前述のヒトプール血清(ロット番号:H15L03Z)に加えて、HAVの予防に使われているガンマグロブリン製剤(図 3B)、及びHAV感染者血清を用いた。ガンマグロブリン製剤はヒトプール血清(図 1A)と同様に事前に添加量の最適化を行った。焼きそばとポテトサラダのいずれでもHAV感染者血清とHAV非感染者血清(前述のHS血清)の増幅曲線の差異は明らかであり、HAVに対してもパントラ法の理論が適用できることがわかった。ヒトプール血清も有効であったが、ガンマグロブリン製剤でも同様の回収率が得られた。

3. 食品中の SaV の検出

NoV以外の食中毒原因物質として報告例があるSaVについて焼きそばとポテトサラダを用いた汚染回収試験を行ったものが図 4Aと図 4Bである。ここではSaV-GV型を用いたが、ヒトプール血清、小児プール血清、ガンマグロブリン製剤のいずれを用いても良好な増幅曲線が得られた。

4. 各ウイルスに対するガンマグロブリン製剤の反応性

前項までの回収試験でガンマグロブリン製剤の有効性が期待できる結果が得られたため、国内製品(化血研と日本製薬)に加えて外国製品(BharglobとGammagard)の反応性をさまざまな下痢症ウイルスについて検証した。表 2 には NoV、表 3 には SaV、表 4 には HAV、表 5 には Ad41 の回収率をそれぞれ示した。全体を俯瞰すると Gammagard を用いた場合の成績が全てのウイルスに対してバランスが取れているのがわかる。

D. 考察

1. 抗体供給源としてのヒト血清

多くのヒトは幼少期にさまざまなウイルス感染を経験しているため、血清中にすでにある程度の抗体を持っているものと考えられる。従って、パントラ法の抗体供給源としてヒト血清を用いることの有用性について最初に検討がなされた。試薬として 10~20 人程度の血清を混合したものが市販されているため、それを利用したところ NoV-GII/4 型の回収については VLP で作製したウサギ抗血清に準ずる効果が得られた(図 2B、図 2C)。この場合、血清の添加量が多すぎると効果がなくなるため、あらかじめ最適量を決定しておく必要がある(図 2A)。これは、ウサギ抗血清と違って、ターゲットとなるウイルスとは無関係の IgG が大量に含まれているため、パンソルビン表面の Protein A と結合する際に競合阻害を起こすことが原因である。ヒト血清を用いる場合には 50mL の反応系に対して 0.5mL の添加により最も良い成績が得られている。一方で、ヒト血清中の抗体含有量には当然のごとく個人差があるため、プール血清といえどもロット間の差が予想された。そこで、10 種類のロットを比較したところ表 1 のように NoV-GII/4 型ではあまり差は見られないが、それ以外の型では使用において問題が発生する製品もあった。抗体含有量は疫学状況を反映しているものと考えられるため、流行の主流である NoV-GII/4 型ではどのロットでも十分な抗体が含まれているものの、GI 型のような大規模な流行が起きていないものについてはロット差が大きくなってしまふという実状がある。購入時にロットごとに事前評価をした上で用いるならば、こうした

問題を回避できるかもしれないが、有効性の低い製品を入手してしまうリスクは存在する。また、別の運用方法として、何かの事例の際に患者の回復期血清が得られたならば、その中には原因ウイルスに対する抗体が含まれていることが期待できるため、限定的な局面での使用という点では考慮に値するものと考えられる。

2. 抗体供給源としてのガンマグロブリン製剤

2010 年 3 月に HAV 感染者の報告数が急増したことから、パントラ法による HAV 回収について検討したものが図 3A と図 3C である。現時点で HAV 特異的なウサギ抗血清は利用できないため、HAV 感染歴のあるヒトの血清と無いヒトの血清を比較することでパントラ法の有効性を確認した。ここで、添加抗体の候補の一つとしてガンマグロブリン製剤を加えた理由は、図 3B に示したとおり、HAV の予防目的の医薬品として使用されており、抗体の供給源となりうる可能性があったからである。結果として、感染者血清やヒトプール血清と同程度の回収効率が得られ、有効性が裏付けられた。特筆すべきは、ヒトプール血清が 10~20 人の血清を混合したものであるのに対し、ガンマグロブリン製剤は 1 万人単位の血漿をプールした上で製造されているということである。従って、ロット間のバラつきはほとんど無くなることを期待できる。

ガンマグロブリン製剤は、ヒト血清中の IgG を抽出したものであるため、HAV 以外の下痢症ウイルスにも幅広く用いることができる可能性があった。そこで、SaV の汚染回収試験(図 4A、図 4B)を行ったところ、良好

な増幅曲線が得られ抗体供給源として有用であることがわかった。

3. 外国製ガンマグロブリン製剤の利用

国内製のガンマグロブリン製剤は、文字どおり全て国内の献血によって得られた血液から製造されている。従って、流行レベルが抑制され、衛生状態が向上するほど抗体含有量が少なくなるという逆説的な問題を内在している。そこで、外国製のガンマグロブリン製剤を利用することで、こうした問題を回避できる可能性が考えられた。その理由として、米国では事実上の“売血制度”によって原料となる血漿が採取されているという事実がある。全血の有償採取は米国の法律でも禁止されているが、血漿のみの採取はこれには該当しないとの解釈のもとに制度が設計されている。実際は、各製薬会社がFDAの許可のもとに各地にプラズマセンターを開設して有償採取を行っている。同様の制度はヨーロッパにもあり、最大手のBaxter社では欧米の血漿をプールしてガンマグロブリンの製造を行っている。このような有償採取の制度のもとでは、低所得者層や途上国からの私費留学生などの比率が高くなることから、多くの公衆衛生分野における調査で明らかとなっている。こうした状況でプールされた血漿から製造されたガンマグロブリン製剤には、当然の帰結として多くのウイルスに対する抗体が含まれていることが予想され、表2～5に示した回収試験の成績にもその傾向が現れている。これらの成績を俯瞰するとBaxter社のGammagardがどのウイルスに対しても効果が認められ、パントラ法のための常用試薬として有用であることがわかる。

4. パントラ法の運用と今後の展開

図5に示すとおり、Gammagardを常備しておくことで、どのような下痢症ウイルスによる事例であっても一通りの対応ができるものと考えられる。VLPで作製したウサギ抗血清は理論上の裏付けがあるため、精度管理などの特定の目的に絞って用いるようにすれば、量的な問題も回避できる。また、表2によるとNoVのGI型に対する回収率は相対的に弱い部分があるため、ブロードバンドモノクローナル抗体により補完してゆく方法が考えられる。一方で、患者の回復期血清を用いるという方法も限定的な局面でならば効果を発揮する可能性がある。特に流通食品が汚染されて複数の都道府県にまたがって患者が発生しているような大規模事例では、最初に感染して回復した人から血液提供の協力を得て原因食品を突き止めるという戦略をとることも可能である。現行の制度下では流通食品の回収命令を出すには、疫学調査に加えて、食品からウイルスを検出することが求められるためこうした方法が有効であるものと考えられる。

今回の研究で新たに浮上してきた問題としては、パンソルビンが品薄になって入手困難な時期があったということである。現在ではメルク社の本国在庫(ドイツ)は回復しているが、今後も在庫切れや製造中止などのリスクが残るため、黄色ブドウ球菌を各試験研究機関で培養してパンソルビンの相当品を自作できるようにすることを計画している。また、ガンマグロブリン製剤の有効性は証明されたものの、パンソルビンの添加量が多いためコスト増となる問題もあり、相当品の自作プロトコルを早急に検討する必要がある。また、実際の事例に適用する場合に備えてGLP

対応を視野に入れたマニュアルを作成することが求められている。

E. 結論

平成 19～21 年度の厚生労働科学研究事業で「どのような食品でも」ウイルスの検査ができる手法として、パンソルビン・トラップ法を開発した。今年度からの研究事業では「どのようなウイルスでも」検査ができるようにするという目標を掲げ、ガンマグロブリン製剤を用いることでそれが可能となった。今後は、全国的な検査体制にどのように落とし込んでいくかを検討してゆく。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 学会発表

斎藤博之、東方美保、岡智一郎、片山和彦、田中智之、野田衛：食品検体のノロウイルス検査のためのパンソルビン・トラップ法の開発と拡大適用、第 58 回日本ウイルス学会学術集会、2010 年 11 月、徳島

斎藤博之、東方美保、岡智一郎、片山和彦、田中智之、野田衛：食品検体のノロウイルス検査を目的としたパンソルビン・トラップ法の開発、第 31 回日本食品微生物学会学術総会、2010 年 11 月、大津

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

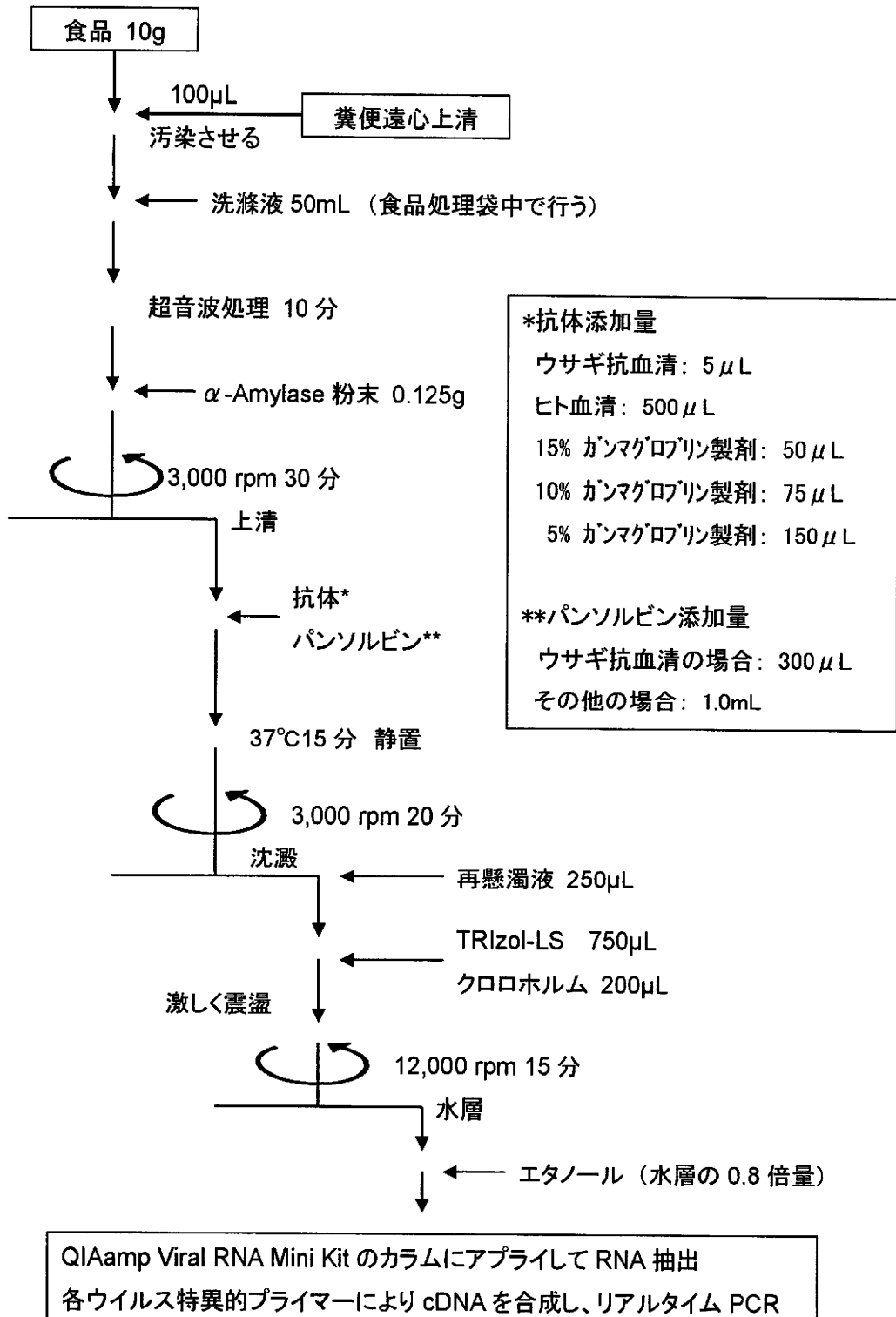


図 1 パンソルビン・トラップ法の操作手順 (Ver.4)

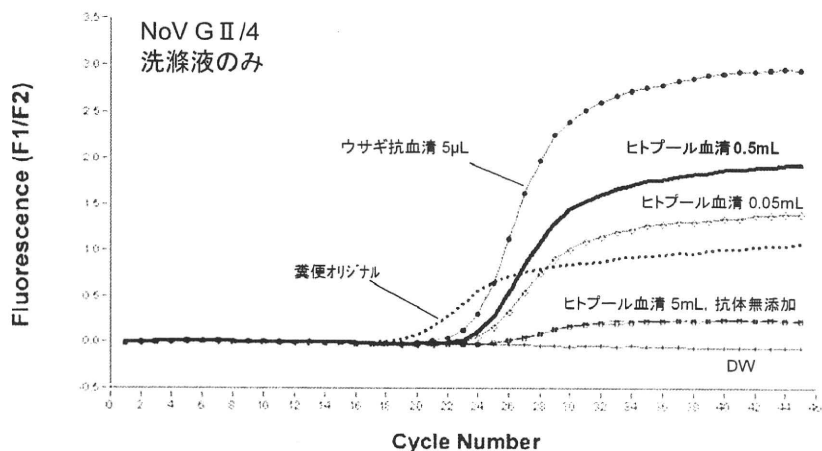


図 2A ヒトプール血清の添加量の検討

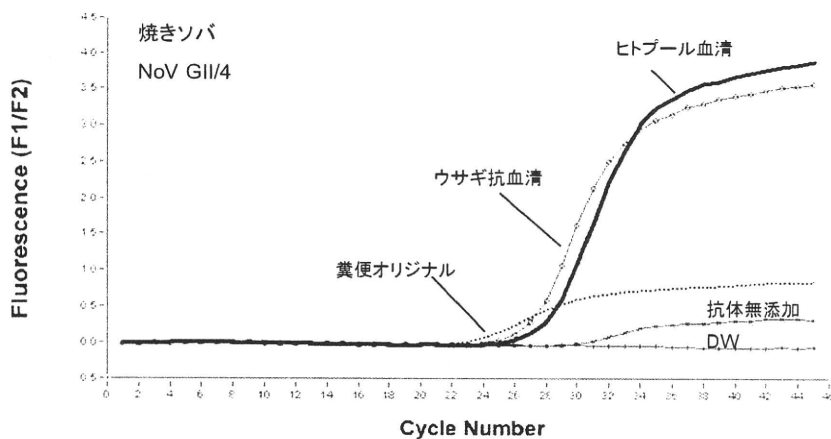


図 2B ヒトプール血清を用いた NoV 回収試験 (焼きそば)

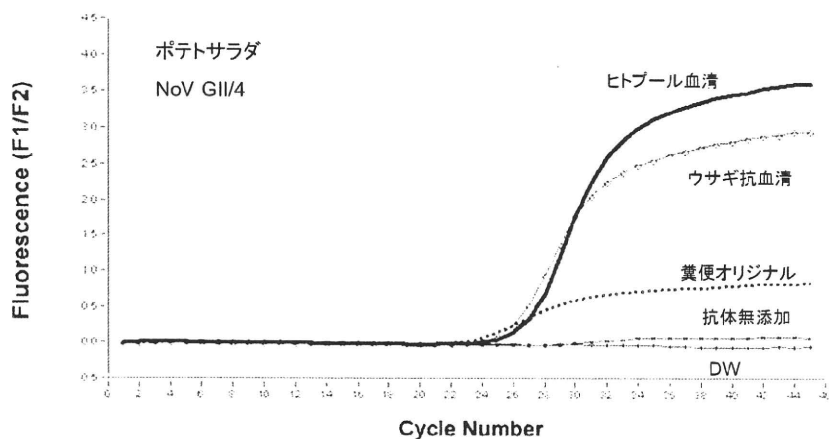


図 2C ヒトプール血清を用いた NoV 回収試験 (ポテトサラダ)

表1 NoV 回収試験におけるヒトプール血清の製造ロットの比較 (回収率・%)

添加抗体 (ロット番号)	NoV						
	GII/4	GII/5	GII/6	GII/18	GI/4	GI/8	HS
ウサギ抗血清	46.29	30.31	8.57	NT	2.65	NT	6.51
H15L03Z	44.66	24.67	13.38	10.03	2.52	1.43	10.64
1690-S10	16.33	30.66	9.08	7.12	1.97	1.20	6.29
1701-S10	47.40	3.34	8.65	1.64	0.63	0.69	4.67
1723-S10	38.94	24.48	14.63	9.47	3.16	1.16	16.30
1746-S10	27.54	7.60	15.79	4.94	2.37	1.07	12.90
1784-S19	27.18	5.69	10.45	3.32	2.05	0.59	19.39
1788B-S20	29.29	11.07	9.38	9.10	2.92	1.15	19.85
1788-S21	39.36	16.37	4.65	8.82	2.49	0.24	23.23
1791A-S20	62.43	14.35	8.74	9.48	3.08	0.73	3.28
1791B-S10	31.94	19.94	4.53	5.60	1.91	0.27	13.83
HS	53.08	1.64	6.82	2.54	1.64	0.30	12.25
無添加	3.57	ND	3.94	ND	0.37	ND	2.93

ウサギ抗体血清は各遺伝子型の単味血清を使用。ヒトプール血清は製造ロット 10 種類を使用。HS は感染歴のある個人の糞便検体と血清。

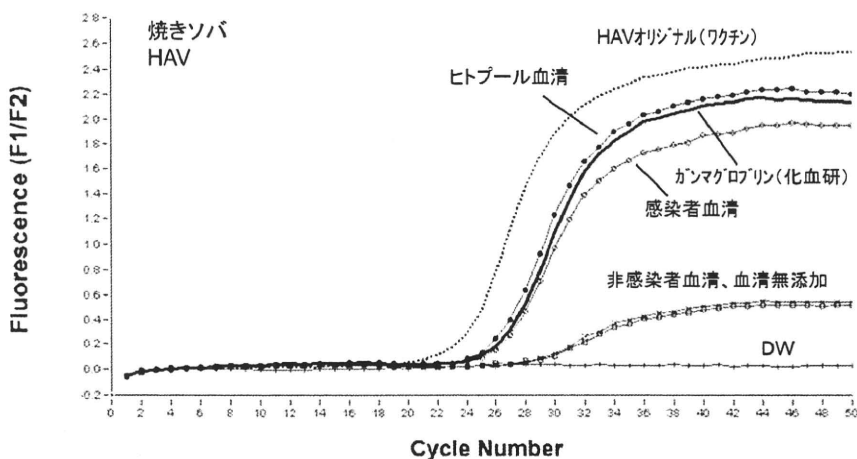


図 3A 各種抗体を用いた HAV の回収試験 (焼きソバ)

【効能・効果】

- ◇無又は低ガンマグロブリン血症
- ◇下記のウイルス性疾患の予防及び症状の軽減
麻疹、A型肝炎、ポリオ

図 3B ガンマグロブリン製剤 (化血研) の効能書き

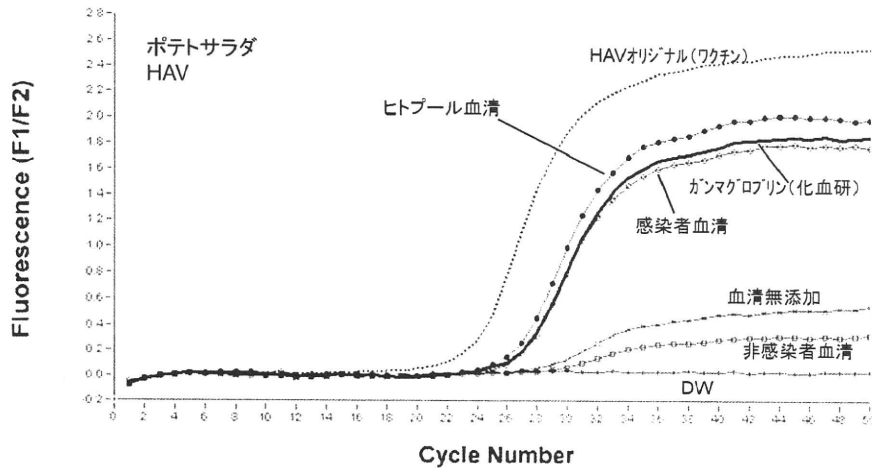


図 3C 各種抗体を用いた HAV の回収試験 (ポテトサラダ)

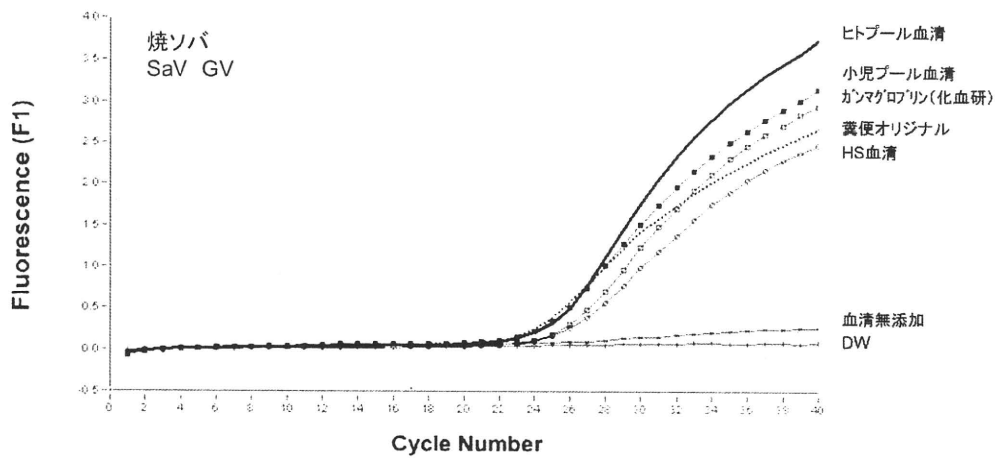


図 4A 各種抗体を用いた SaV の回収試験 (焼きソバ)

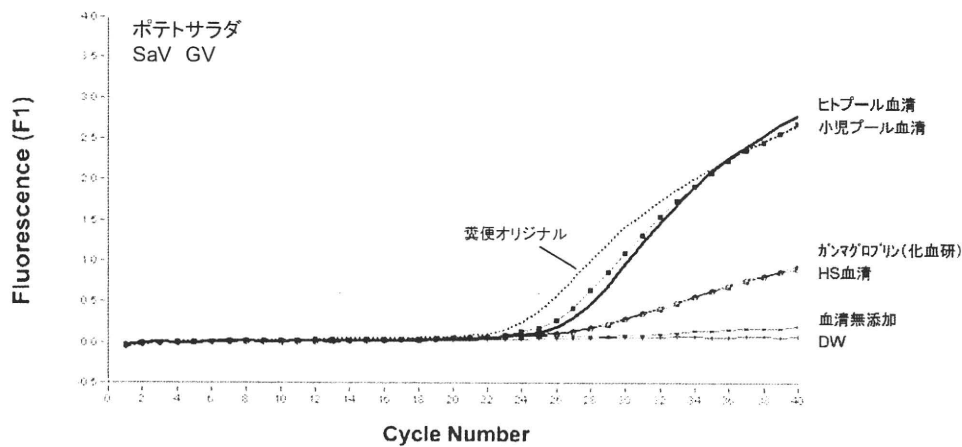


図 4B 各種抗体を用いた SaV の回収試験 (ポテトサラダ)

表2 ガンマグロブリン製剤を用いた NoV 回収試験 (回収率・%)

添加抗体	NoV										
	GII/2	GII/3	GII/4	GII/5	GII/6	GII/13	GII/18	GI/3	GI/4	GI/8	GI/9
ウサギ抗血清	93.4	14.8	77.3	36.4	18.4	NT	NT	50.4	14.3	13.0	NT
ヒトプール血清	27.2	11.8	45.2	13.9	13.4	37.9	11.6	6.9	8.9	1.4	1.3
Gグロブリン(化血研)	29.4	11.3	56.4	17.1	7.5	33.6	10.0	3.9	8.1	2.0	1.5
Gグロブリン(日本製薬)	26.1	15.6	32.5	16.0	10.6	46.4	11.2	8.9	6.7	1.1	6.2
Bharglob	33.6	12.4	32.9	17.5	19.7	48.8	11.7	7.7	8.8	0.9	14.7
Gammagard	45.1	12.4	45.7	22.4	11.9	55.5	9.4	12.6	12.6	2.7	7.0

ウサギ抗体血清は各遺伝子型の単味血清を使用。

表3 ガンマグロブリン製剤を用いた SaV 回収試験 (回収率・%)

添加抗体	SaV			
	GI	GII	GIV	GV
小児プール血清	10.4	28.0	10.5	17.8
ヒトプール血清	14.0	26.3	14.1	27.1
Gグロブリン(化血研)	8.8	25.0	8.0	20.3
Gグロブリン(日本製薬)	7.7	24.9	20.2	23.7
Bharglob	4.9	27.9	9.6	27.1
Gammagard	8.0	30.3	16.9	35.3

表4 ガンマグロブリン製剤を用いた HAV 回収試験 (回収率・%)

添加抗体	HAV
感染者血清	7.6
ヒトプール血清	15.2
Gグロブリン(化血研)	8.4
Gグロブリン(日本製薬)	8.0
Bharglob	13.5
Gammagard	13.7

表5 ガンマグロブリン製剤を用いた Ad41 回収試験 (回収率・%)

添加抗体	Ad41
小児プール血清	63.6
ヒトプール血清	17.1
Gグロブリン(化血研)	6.0
Gグロブリン(日本製薬)	8.9
Bharglob	5.6
Gammagard	38.4

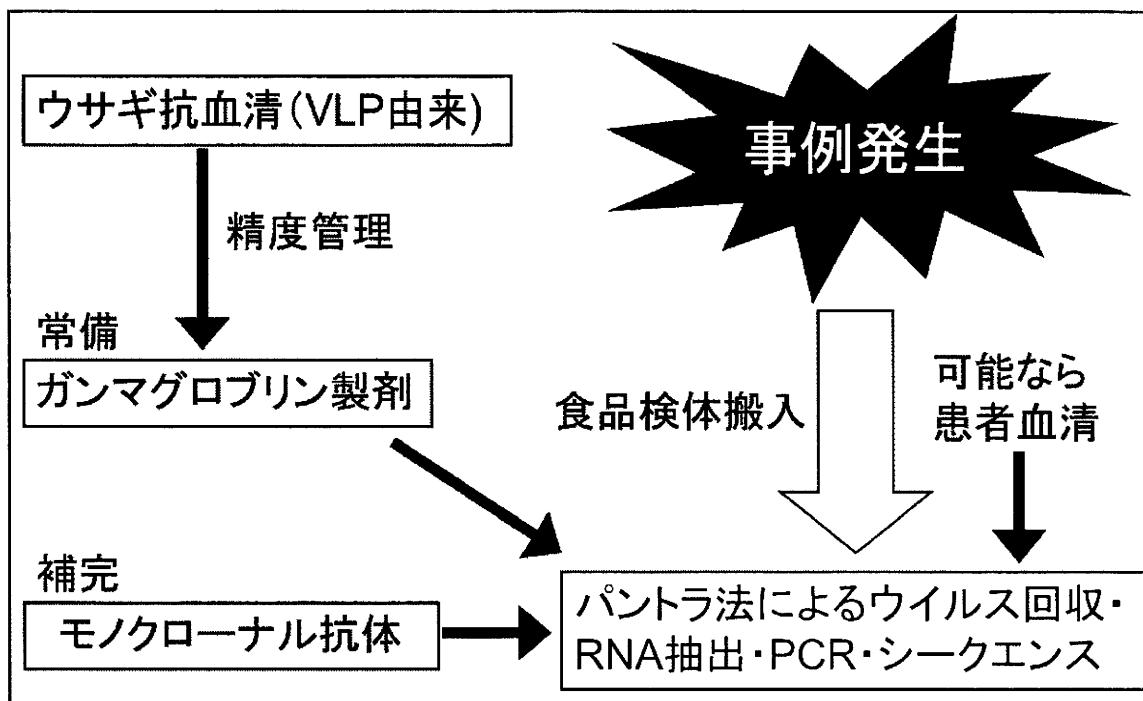


図5 パンソルビン・トラップ法の運用モデル

ノロウイルス迅速遺伝子型分別システムの開発

研究分担者 鈴木 善幸 名古屋市立大学
研究協力者 小林 由紀 名古屋市立大学

研究要旨

ノロウイルスでは ORF1 と ORF2-3 の間で遺伝子組み換えが起こることが知られているがその頻度は未知である。本年度は、遺伝子組み換えの頻度を推定するために、ORF1 と ORF2-3 それぞれの領域で作成された系統樹を比較して遺伝子組み換えを検出できる方法の開発を目的とした。特に、今後ノロウイルスの配列データは爆発的に増加し系統樹の信頼性が低下すると考えられるが、大量の配列データから効率良く遺伝子組み換えを検出できる方法の開発を目的とした。解析に用いられる配列の数が多いときでも統計的有意性を保証しながら遺伝子組み換えを検出できる方法として、4 株を抽出してその系統関係を領域間で比較する。支持された樹形が領域間で異なれば遺伝子組み換えが起こったと推測される。さらに、系統樹において遺伝子組み換えが起こった場所は外部枝に存在すると考えられる。この方法の有用性を検証するために、インフルエンザウイルスのゲノム配列を解析したところ、分節単位での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た。今後はこの方法をノロウイルスにおける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。

A. 研究目的

「ノロウイルス迅速遺伝子型分別システムの開発」という研究項目名のもと、(1) ノロウイルスゲノム配列について、構造遺伝子領域・非構造遺伝子領域それぞれで系統樹を作成することによる、領域間でゲノム組み換えのないクラスターとしての遺伝子型分類体系の確立、(2) 構造遺伝子領域・非構造遺伝子領域それぞれでのノロウイルスゲノムに働く自然選択圧の検出、を主な

目的として研究を行う。

ノロウイルスにおいては、ORF1 と ORF2-3 の間で遺伝子組み換えが起こることが知られているが、その頻度は未知である。本年度は、遺伝子組み換えの頻度を推定するために、ノロウイルスの ORF1 と ORF2-3 それぞれの領域で作成された系統樹を比較して遺伝子組み換えを検出できる方法の開発を目的とする。特に、今後ノロウイルスの配列デー