

201131026A

厚生労働科学研究費補助金
食品の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23年度 総括・研究分担報告書

研究代表者 野田 衛

平成24 (2012) 年 3月

厚生労働科学研究費補助金
食品の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 23 年度 総括・研究分担報告書

研究代表者 野田 衛

平成 24 (2012) 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. パンソルビン・トラップ法による食品中からノロウイルス遺伝子の検出—
幼稚園で見られた集団ノロウイルス食中毒事例から—
田中 智之 他 ----- 33
2. パンソルビン・トラップ法の実用上の問題点解決に向けた検討
斎藤 博之 ----- 43
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 ----- 61
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. サポウイルスカプシド蛋白質の抗原部位の推定
横山 勝 ----- 67
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法の開
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
村上 耕介 他 ----- 77
8. 日本における 2011 年の A 型肝炎の分子疫学的解析
石井 孝司 他 ----- 83
9. A 型肝炎ウイルス検出 PCR の高感度化の検証
野田 衛 他 ----- 89
10. Genotype 5 と 6 HEV 構造蛋白の発現および抗原性の解析
李 天成 他 ----- 99

III. 研究協力報告書

1. 研究協力者総括報告書
田中 智之 他 ----- 105
2. 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—種々の食
品への応用—
篠原 美千代 他 ----- 111
- 牛血清アルブミンとポリエチレングリコールを使用した水性二相分配法に
よるノロウイルスの濃縮法の検討
田村 務 他 ----- 119

厚生労働科学研究費補助金
食品の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 23 年度 総括研究報告書

研究代表者 野田 衛

平成 24 (2012) 年 3 月

平成 23 年度厚生労働科学研究費補助金(食品の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。

(1)食品からのウイルス検出法の開発・標準化

パンソルビントラップ法汎用化プロトコルを用いて、実際の食中毒事例の食品からノロウイルス(NoV)の検出に成功した。パンソルビンの自家調製用プロトコルを構築した。非晶性リン酸カルシウム微粒子法で回収率が低いミートソーススパゲティでイソアミルアルコール処理の導入で回収効率が改善された。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討ではプラーク法の感染価は予期した値より低く、遺伝子検査結果とは必ずしも一致しなかった。

(2)ウイルス性食中毒の検査体制の強化

新たにサポウイルス(SaV)5株のVLPの作製に成功した。SaVのすべての遺伝子群に交叉する抗体および遺伝子群特異的あるいは遺伝子型特異的な抗体を得た。1D-3Dプロファイル法でSaVカプシド蛋白質上の機能部位および抗原部位を推定した。A型肝炎ウイルス(HAV)検出 nestedPCRの検出感度および分子疫学的解析能の向上が図れた。蛍光マルチプレックスRT-PCRおよびリアルタイムPCRによる複数ウイルスの同時検出系の迅速化・開発を行った。水性二相分配法によるふきとり等清浄な液体からのNoV濃縮法を開発した。E型肝炎ウイルス(HEV)の新しい遺伝子型G5およびG6の抗原性はG1, G3, G4 HEVと類似し、ワクチン開発等に有用と思われた。

(3)食品、動物、環境の汚染実態調査と分子疫学的研究

2010/11シーズンのGII.4等NoV分離株118株のゲノム全長の塩基配列を新たに決定した。2006年以降の分離株/07年以降主流であった2006b亜型は減少傾向を示し、2010/11年は2006b亜型と2009a亜型が流行した。2010/11に検出されたGII.2, GII.3はキメラウイルスであった。2011年に検出されたHAVは遺伝子型1A, IIIA, IIIBに分類され、千葉市のA型肝炎集団食中毒由来株を含む、国内常在株が大半を占めた。生食用市販カキ8ロット中3ロット(37.5%)、岩ガキ18検体中2検体からNoVが検出

された。プライマー等の変更で下水からの SaV の検出が改善した。臨床と環境の両面から下痢症ウイルス感染をみると、臨床症状として表面化しない多様な下痢症ウイルスの浸淫が示唆された。ブタ廃棄肝臓の 6% から HEV 遺伝子が検出された。ブタ血清の 72% が抗 HEV IgG 抗体陽性で、養豚場間で抗体保有率に大きな差がみられた。

(4) 食品媒介性ウイルスの疫学的、基礎的研究

食中毒関連のアサリを個別に処理し、PCR 産物をクローニングした結果、患者から検出されたすべての遺伝子型の SaV を検出することができた。二枚貝食中毒事例等について検査した結果、NoV 以外に SaV、アイチウイルス、アストロウイルス、A 群ロタウイルス (ARV)、アデノウイルスが検出された。SaV と ARV は成人における集団胃腸炎(食中毒を含む)の起因ウイルスとして、NoV の次に注目すべきウイルスであると考えられた。糞便中に排泄される NoV 量は、患者と不顕性感染調理従事者で大差はなかった。

研究分担者		石田 勢津子	同上
田中 智之	堺市衛生研究所	森 功次	東京都健康安全研究センター
斎藤 博之	秋田県健康環境センター		
	一	秋場 哲哉	同上
鈴木 善幸	名古屋市立大学	永野 美由紀	同上
本村 和嗣	国立感染症研究所	林 志直	同上
横山 勝	同上	入谷 展弘	大阪市立環境科学研究所
片山 和彦	同上		
村上 耕介	同上	改田 厚	同上
石井 孝司	同上	阿部 仁一郎	同上
李 天成	同上	関口 純一朗	同上
		久保 英幸	同上
研究協力者		小和田 和誠	福井県衛生環境研究センター
内野 清子	堺市衛生研究所		
三好 龍也	同上	中村 雅子	同上
岡山 文香	同上	平野 映子	同上
西口 智子	同上	大村 勝彦	同上
吉田 永祥	同上	田村 務	新潟県保健環境科学研究所
小林 由紀	名古屋市立大学		
吉澄 志磨	北海道立衛生研究所	阿部 勝彦	広島市衛生研究所
後藤 明子	同上	山本 美和子	同上

田中 寛子	同上	齋藤 幸一	同上
藤井 慶樹	同上	増本 久人	佐賀県衛生薬業センタ
植木 洋	宮城県保健環境センタ		ー
	ー	南 亮仁	同上
篠原 美千代	埼玉県衛生研究所	野田 日登美	同上
内田 和江	同上	江口 正宏	同上
島田 慎一	同上	古川 義朗	同上
富岡 恭子	同上	靄田 清典	同上
鈴木 典子	同上	船津丸 貞幸	佐賀県食肉衛生検査所
峯岸 俊貴	同上	小林 慎一	愛知県衛生研究所
河橋 幸恵	同上	原田 誠也	熊本県保健環境科学研
岸本 剛	同上		究所
重本 直樹	広島県立総合技術研究	西村 浩一	同上
	所保健環境センター	岩切 章	宮崎県衛生環境研究所
飯塚 節子	島根県保健環境科学研	横井 一	千葉市環境保健研究所
	究所	田中 俊光	同上
北元 憲利	兵庫県立大学	小林 圭子	同上
山下 育孝	愛媛県立衛生環境研究	斎藤 哲也	新潟市衛生環境研究所
	所	吉田 徹也	長野県環境保全研究所
立花 早苗	同上	柴田 伸一郎	名古屋市衛生研究所
青木 里美	同上	岡 智一郎	国立感染症研究所
川口 利花	同上	戸高 玲子	同上
三上 稔之	青森県環境保健センタ	片岡 紀代	同上
	ー	高橋 和明	東芝病院
筒井 理華	同上	三代 俊治	同上
吉田 綾子	同上	上間 匡	国立医薬品食品衛生研
井上 治	同上		究所
名古屋 真弓	富山県衛生研究所		(順不同)
板持 雅恵	同上		
堀元 栄嗣	同上		
小渕 正次	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		
高橋 雅輝	同上		

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：NoV 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) パンソルビン・トラップ法の実用化およびその問題解決に向けた検討

昨年度までに開発したパンソルビン・トラップ法の汎用化プロトコルの有用性を検証するために、NoV GII/4 を汚染させたポテトサラダおよび焼きそばからの回収試験を3回繰り返し実験し、回収率と標準偏差を求めた。また、本法の試験の根幹を成すパンソルビンはメルク社でのみ製造されており、品薄等により入手困難となる局面が想定されることから、相当品を自作するプロトコルについて検討した。

(2) パンソルビン・トラップ法の食中毒事例への適用

パンソルビン・トラップ法を2011年9月に大阪府堺市の幼稚園で発生した大規模NoV食中毒事例の原因食品の特定のための検査に適用した。

(3) 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

今年度は、キメラ型(組み換え型)のNoVの迅速な分析・同定法の確立を目的として、新たなプライマーセットによるPCR増幅系を確立するとともに、その検査に必要な標準プラスミドの作製を行った。すなわち、ウイルスゲノム全塩基配列が決定されていない遺伝子型に属する株18株の全塩基配列を決定し、ClustalWでアライメント後、高度に保存された領域を

検索し、ORF1-ORF2 ジャンクション領域上流約 1 Kb 付近に、新規 sense プライマーを設計した。設計した新規プライマーと、G1SKR または G2SKR を用いて RT-PCR を行い、約 1300~1000 bps の増幅産物を確認した。

(4) 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)についてポテトサラダ等 24 品目の食品についてネコカリシウイルス(FCV)を用いた添加回収実験および回収率の低かった一部の食品について回収率向上のための検討を行った。

(5) ヒト糞便由来ウイルス汚染指標のためのカキ中の F 特異的大腸菌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 特異的大腸菌ファージ(F ファージ)の有用性を検証することを目的として、F ファージのプラーク数測定および群型別遺伝子検出を行い、NoV の検出と比較した。

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別システムの開発

NoV 迅速遺伝子型別システムの開発を目的として、NoV の変異で一般的にみられるギャップの挿入に関してギャップを正確に入れない場合の自然選択圧の検出に対する影響を明らかにするため、アミ

ノ酸配列で多重整列を作成後コドン配列に変換する方法の非同義置換速度/同義置換速度比推定にあたる影響を検討した。

(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 につい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 VLP 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) A 型肝炎ウイルス検出 nestedPCR 法の改良

A 型肝炎ウイルス(HAV)検出 nestedPCR 法の検出感度および分子疫学的解析能の向上を目的として、プライマーセットを新たに設計し、A 型肝炎患者 54 名から採取された血清および糞便を対象に通知法と検出率を比較するとともに、通知法と改良法の PCR 産物から得られるシーケンスデータを基に系統樹解析結果を比較した。

(4) E 型肝炎ウイルス genotype5 (G5) および 6 (G6) のウイルス様中空粒子の作製と抗原性解析

G5 と G6 の E 型肝炎ウイルス(HEV) ORF2 を RT-PCR 法で増幅後、組換えバキュロウイルスを用い Tn5 細胞で構造蛋白を発現

させ、ウイルス様粒子(HEV-LPs)を作製した。HEV-LPsを免疫し、抗HEV-VLPs抗体を得た。抗体検出ELISA法、抗原検出ELISA法を樹立し、G1, G3, G4 HEVの抗原性と比較した。

(5) 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、集団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, アストロウイルス(AstV), アイチウイルス(AiV), ボカウイルス(BoV), パレコウイルス(PeV)の同時検出法およびマルチプレックスリアルタイムPCR法によるSaV, AstV, A群ロタウイルス(ARV), C群ロタウイルス(CRV), 腸管アデノウイルス(EAdV), エンテロウイルス(EnV)の同時検出法を検討した。

(6) ふきとり検体からの高感度なウイルス検出法の開発

ふきとり検体等比較的清浄な検体からのウイルス検出法の確立を目的として、牛血清アルブミン, ポリエチレングリコール6000, およびNaClを使用した水性二相分配法による濃縮法を検討した。

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 等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15日~2011年3月10日に20の道府県で発生し、地方衛生研究所(地研)にてNoV感染症と確定した469

症例を対象に、NoV検出株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、NoVやSaVの主要抗原となるカプシド蛋白質の抗原部位や機能部位を推定する新しい手法の開発を目的として、SaVカプシド蛋白質(N=107)について1D-3Dプロフィール法による解析を行った。

(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, EnV, AstV, AdV, AiV, ARV, CRV, HAVの検索を実施した。

また、ブタ, イノシシおよびシカ肉のHEVの感染源および抗体保有状況調査を行った。

(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)

(3) A型肝炎の分子疫学的研究

2011年に千葉市を中心として各地のA型肝炎患者から検出されたHAV52株について厚生労働省通知法に従い、HAVゲノムの構造/非構造領域のjunction部分の配列をRT-PCR法により増幅後決定し、これらの配列を過去のデータベースと比較し分子疫学的に解析した。

4. 食品媒介性ウイルスの疫学的, 基礎的研究

(1) アサリ関連事例由来 SaV の遺伝子解析

アサリを原因食品とする食中毒事例について、アサリから従来法および新規法で検出されたSaVの特徴を把握するために、増幅産物をクローニングし、塩基配列を決定した。

(2) 食品媒介事例等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, ARV, CRV, BoV, AdV, PeV, HAV の検索を実施した。

また、食品媒介事例から検出される NoV 以外の胃腸炎起因ウイルスの検出意義を明確にするために、成人における各種胃腸炎起因ウイルスの感染実態について感染症集団事例を中心に調べた。

(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)

(3) 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、散发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) パンソルビン・トラップ法の実用化およびその問題解決に向けた検討

NoV-GII/4 で汚染させたポテトサラダの汎用プロトコルによる回収率は抗 NoV-GII/4 ウサギ血清が $78.3 \pm 10.8\%$ 、Gammagard が $24.4 \pm 3.6\%$ であり、抗体を添加しなかった場合の $0.33 \pm 0.08\%$ と比べて有意 ($p < 0.05$) に高い数値を示した。焼きそばからの回収試験も抗 NoV-GII/4 ウサギ血清 $81.5 \pm 10.2\%$ 、Gammagard で $25.6 \pm 2.3\%$ であり、抗体無添加の場合の $1.15 \pm 0.25\%$ と比べて有意 ($p < 0.05$) に高い回収率を示した。パンソルビンを自家調製し、洗滌液からの NoV 回収実験を行ったところ、ウサギ抗血清、ヒトプール血清、各種ガンマグロブリン製剤のいずれを添加した場合でも、市販品と同等の回収率が得られた。(斎藤研究分担報告書)

(2) パンソルビン・トラップ法の食中毒事例への適用

2011 年 9 月に大阪府堺市の食中毒事例において、パンソルビン・トラップ法 (Gammagard 使用) を適用したところ、「そ

ら豆煮物」から NoV GI(102 コピー/g)と NoV GII(44 コピー/g)が検出された。また、別ロットの「そら豆の煮物」と「こんにゃくのキンピラ」から semi-nested PCR で NoV GII が検出された。

(田中研究分担報告書, 斎藤研究分担報告書)

(3) 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

新たな NoV 18 株の全長塩基配列の解析により, GI. 1-14, GII. 1-10, 12, 15, 16, 18, のゲノム全長のアライメントに成功した。RdRp N-terminal 領域から Capsid N/S 領域の約 1300 nt を増幅するために, RdRp N-terminal 領域に sense プライマーを GI, GII それぞれにデザインした。プライマーは, 多様性の認められたコドン 3 に混合塩基を組み入れ, 20 - 30 nt の長さとした。SKR シリーズとの semi-nested RT-PCR により, GI では, 約 1100 nt, GII では, 約 1000 nt の増幅産物が得られることが明らかになった。インビトロで合成した合成 RNA スタンダードを用いた検討では, 検出感度が 10~100 copies/test tube であり, SK シリーズプライマーセットを用いたコンベンショナルな RT-PCR とほぼ同等の感度を有することが明らかになった。

(片山研究分担報告書)

(4) 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

野菜類では冷凍ラズベリーを除き 16~73%と効率良くウイルスが回収されたが, 穀物類では 1~33%, 食肉・

魚肉類では 7~45%で, 一部の食品は低い回収率であった。回収率が低かったミートソーススパゲティはイソアミルアルコール処理を追加することにより, 回収率が大幅に改善した。

(篠原研究協力報告書)

(5) 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

カキ中の F フェージプラーク数はリアルタイム PCR 法から推定される数より低い傾向にあった。プラーク法による F フェージの検出はリアルタイム PCR 法による検出と必ずしも一致しなかった。NoV の検出はプラーク法よりリアルタイム PCR 法での F フェージの検出と一致する傾向にあった。

(阿部研究協力報告書)

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

アミノ酸配列で多重整列を作成してから個々のアミノ酸をコドンに変換するという方法で得られたコドン配列の多重整列を用いて非同義置換速度/同義置換速度比を推定すると, 比が過大推定されることが明らかになった。

(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

新たに SaV 8 株について VLPs 発現コンストラクトおよびシード組換えバキュロウイルスを作製した。このうち 5 株

(GII. 3 Kushiro 株, GII. 3 Nayoro 株, GII. 4

Kumamoto6株, GII.7 20072248株, GIV Yakumo株)のVLPの発現を試み,いずれも発現に成功した。電子顕微鏡観察により,これらVLPsはSaVに特徴的な形態を有していた。

(村上研究分担報告書)

新規に作製したMAbsを加えて,各遺伝子群(GI, GII, GIVおよびGV)の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抗体の反応性を調べたところ,すべての遺伝子群に交叉する抗体および遺伝子群特異的あるいは遺伝子型特異的な抗体を得た。

(北元研究協力報告書)

(3) A型肝炎ウイルス検出 nestedPCR法の改良

通知法のプライマーセットを用いた場合,54検体中9検体がnested PCRで陰性,5検体で増幅バンドがスミアとなったのに対して,改良プライマーセットでは,陰性が2検体となり,陽性率は83.3%から96.3%へと改善された。2010年5月の堺市の1下水検体では,通知法や名古屋市プライマーではVP1-2A領域を増幅できなかったが,改良法のプライマーセットで陽性となった。

通知法の実質的な解析領域は約230bp程度であり,韓国や中国の増幅部位とはずれがあり,150bp程度しか比較ができなかったが,改良法では通知法や韓国・中国の解析領域を含む約590bpを決定することができた。系統樹解析ではBootstrap value値が改善された。

(野田研究分担報告)

(4) E型肝炎ウイルス genotype5 (G5)および6(G6)のウイルス様中空粒子の作

製と抗原性解析

N末端111個アミノ酸を欠損したG5およびG6 HEV ORF2 ゲノムから組換えバキュロウイルスを用いて直径約24nmのHEV-LPsを大量に得た。G5とG6のHEV-LPsは形態的にG1, G3, G4 HEV-LPsと類似し,抗G5 HEV-LPs抗体を用いた抗原検出ELISAによりG1, G3, G4 HEVを高感度で検出できた。抗G5 HEV-LPs抗体と抗G6 HEV-LPs抗体はPLC/PRF/5細胞へのG1, G3およびG4 HEVの感染を阻止した。

一方,N末端13個アミノ酸を欠損したG5とG6 HEV ORF2 ゲノムから,直径35~38nmのネイティブなウイルス粒子とほぼ同じ直径を有する粒子が形成され,またこの粒子内に構造タンパクをコードする遺伝子を取り込まれていることを確認した。

(5) 食品媒介ウイルスの簡便な同時検出法の開発

昨年報告したNoV, SaV, AstVの蛍光RT-マルチプレックスPCRにAmpliTaq Gold Fast PCR Master Mix, UP(ABI)を用いることで,反応時間が半分(1.5時間)に短縮された。また,新たにAiV, BoV, PeVの蛍光RT-マルチプレックスPCR法を構築し,有効性が確認された。2010/11年シーズンの下痢症集団感染事例17例について適用したところNoV GIIが13例, AstVが1例から検出された。

(重本研究協力報告書)

6種類のウイルスを検出するマルチプレックスリアルタイムPCRについて,アニーリング温度, プライマー・プローブ濃度等を検討し,良好な検出感度が得ら

れた。本法により小児胃腸炎患者 96 検体中 43 検体，集団発生事例 51 事例 449 検体中 3 事例 9 検体から NoV 以外の腸管系ウイルスを検出した

(小和田研究協力報告書)

(6) ふきとり検体からの高感度なウイルス検出法の開発

BSA，ポリエチレングリコール 6000，および NaCl を使用した水性二相分配法により，PBS (-) に添加した NoV を BSA 層に濃縮することができた。8ml および 35ml の PBS (-) に $10^4 \sim 10^5$ 個の NoV 添加回収試験により，37% から 85% の回収率が得られた。

(田村研究協力報告書)

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 等流行株の全遺伝子解析と構造解析

2010/11 シーズンの GII. 4 等 NoV 分離株 118 株のゲノム全長の塩基配列を新たに決定した。それを含め 2006 年～2011 年に得られた 395 株について遺伝子解析を行い，以下の結果を得た。

① GII. 4 は 8 種類の亜型に分類された。② そのうち 2006b 亜型が 5 シーズンにわたり優勢株であった。③ GII. 4 株には 2010/11 シーズンに新しい亜型の出現はみられず，2009a 変異株 (NewOrleans_U. S. _2008) が昨シーズンに引き続き検出された。④ GII. 2 は 3 種の亜株が検出され，そのうちの 2 種はキメラウイルスであった。カプシド蛋白質には，過去の流行株には認められない特徴的なアミノ酸置換が生じていた。⑤ GII. 3 はキ

メラウイルスで，カプシド蛋白質 P2 領域に過去の流行株には認められない特徴的なアミノ酸置換が生じていた。

(本村研究分担報告書)

SaV カプシド蛋白質二量体分子モデルは S ドメイン，P1 ドメイン，および P2 ドメインからなり，S ドメインと P1 ドメインは長いリンカーで結ばれ，P2 ドメインの大部分はループ構造であった。SaV カプシド二量体分子モデルで，大きい共分散を示す部位はカプシド全体に，小さい共分散を示す部位は，D365，F383，I428，S470 の周辺のアミノ酸座位に見られた。大きいエントロピーを示す部位は P2 ドメインに集中し，内部側になるに従い減少した。D365 や I428 周辺の部位はカプシド蛋白質の最上部表面に位置したが，エントロピーは小さく，カプシド蛋白質二量体との結合表面近傍に位置する S470 周辺の部位もエントロピーは小さかった。

(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 2011 年 12 月に採取(買取)された国産生食用カキ 8 ロット中 3 ロット (37.5%) から NoV が検出された。ウイルス量 (RNA コピー数) は 192～325 コピー/個であり，すべて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。HAV はすべて陰性であった。

(入谷研究協力報告書)

② 青森県において 2011 年 1 月～12 月に下水処理施設で採取された 29 検体のうち，合流水 29 検体では NoV GI が 25 検体，NoV GII が 26 検体，AstV が 27 検体，分流水 29 検体では NoV GI，NV GII，SaV

およびAstVが29検体、SaVが1検体から検出された。市販生カキ9パック(カキ18検体、パック水9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2011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、下水処理場で同期間に採取した下水流入、および岩カキについてNoVおよびSaVの検出を行った。NoVは例年とおりGII.4が主流であったが、6月にはGII/2が患者、下水、岩ガキから検出され、この時期の流行型であった。2003年以降、NoVのGII.3型はキメラウイルスがほとんどであった。

(名古屋研究協力者報告書)

④ 堺市において、2011年1月～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。臨床材料からは8種類、環境検体からは16種類の遺伝子型のNoVが検出された。臨床検体からはSaVの検出は少なく、AstVおよびAiVの検出はなかったが、環境検体からは高頻度に検出された。

(内野研究協力者報告書)

⑤ 岩手県において2008年11月～2009年3月に河口部に垂下したカキおよびその上流の下水処理場の下水流入水、放流水、および河川水について各種胃腸炎ウイルスの検出を試みたところ、下水や垂下カキから上流域で発生している感染性胃腸炎を反映した下痢症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2011年1月～12月に流入水を採取し、ウイルス検索を行った結果、NoVは21検体、SaVは11検体、AstVは7検体、AiVは2検体から検出された。SaV検出プライマーなどを改変した結果、高感度にSaVが検出された。

(増本研究協力報告書)

⑦ 熊本県においてイノシシ、シカおよびブタのHEV保有状況およびブタ血清中の抗HEV IgG抗体保有率を調査した。イノシシでは17頭中1頭(肝臓)からHEV遺伝子が検出されたが、シカは陰性であった。ブタでは血清420検体は陰性であったが、廃棄肝臓133検体中9検体(6%)(8頭は同一養豚場)からHEV遺伝子が検出された。ブタ血清の72%が抗HEVIgG抗体陽性で、養豚場間で抗体保有率に大きな差がみられた。

(西村研究協力者報告書)

(3) A型肝炎の分子疫学的研究

HAV 52株は系統樹解析により遺伝子型IA 46株、IIIA 5株、IIIB 1株に分類された。IAの大部分は千葉市における集団食中毒事例に由来し、IA-1に属した。2011年春季のA型肝炎多発の主要な原因であったIA-2に属する株は1株のみであり、IA-1およびIA-2に属さないIAが、パプアニューギニアあるいはブラジルでの感染と考えられる患者からそれぞれ1株ずつ検出された。

2011年1月に千葉市で発生したA型肝炎集団食中毒事例は、最終的に患者数49名の大きな事例になった。患者の2010年11月下旬～12月中旬における喫食状況等から同市内寿司店で調理、提供された食

事が原因であることが明らかとなった。検出されたHAVはIA-1クラスターに属し、2010年に日本で広域的に流行したIA-2やIIIAに属する株とは異なり、また、2010年6月に千葉市内での散発事例から検出された1株とは異なる塩基配列を有していた。本株は2006年に滋賀や新潟で小流行した株と類似しており、国内常在株が原因であると考えられた。また、その遺伝子配列は患者2検体(99.7%)を除く34検体が100%一致し、同一感染源に由来する株であることが強く示唆された。

4. 食品媒介性ウイルスの疫学的、基礎的研究

(1) アサリ関連事例由来サポウイルスの遺伝子解析

2008年のアサリ関連食中毒事例の保存アサリ60個を個別に検査して得られたPCR増幅産物をクローニング後塩基配列を決定した。従来法陽性27検体のうち1検体は非特異増幅産物であったが、新規法で増幅された41検体はすべてSaVであった。従来法および新規法で8遺伝子型のSaVが検出され、それらは概ね一致した。

(飯塚研究協力報告書)

(2) 食品媒介事例等におけるノロウイルス以外の胃腸炎ウイルスの検索

① 東京都において2010年1月～12月に発生した胃腸炎集団発生565事例のうち269事例(47.6%)からウイルスが検出され、そのうち256事例はNoV、27事例(10.1%)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の4事例で、

生カキ関連事例はNoVとSaVの同時検出であった。

(森研究協力報告書)

② 大阪市において2001年1月～2004年11月、2010年12月～2011年12月に発生したカキ関連食中毒50事例の患者糞便186検体のうち、18事例(36.0%)、32検体(17.2%)から4種類のウイルス(AiV 20検体、AstV 8検体、SaV 3検体、ARV 1検体)が検出され、そのうちの単独検出例は9検体であった。

(入谷研究協力報告書)

③ 北海道において2010年4月～2011年7月に発生した集団胃腸炎事例139事例を調査した。保育所・幼稚園および小学校の幼児や小児における集団感染事例ではNoV、ARV、SaV、AstV、AsV、PeVなど多彩なウイルスが検出されたが、大人における集団事例では大半がNoVで、それ以外ではSaV、ARVが比較的多く検出された。二枚貝関連事例の患者から比較的頻繁に検出されるAiVは、小児を含め二枚貝非関連食品媒介事例、感染症事例からはほとんど検出されなかった。

(吉澄研究協力報告書)

(3) 地域における食品媒介事例等の疫学的研究

① 愛媛県で2011年2月に発生した不顕性感染の調理従事者が原因と考えられた食中毒において、糞便中に排泄されるNoV量は患者と不顕性感染者で大差はなかった。2011年に検出されたGII.4は、2006b亜型と愛媛県で2010年から検出されている新しい変異株である2009a(NewOrleans1805/2009/USA近縁)タイプであった。検出されたGII.2、GII.3および

びGII. 13はVP1領域とポリメラーゼ領域の間で遺伝子組換えを起こしたキメラウイルスであった。

(山下研究協力報告書)

② 愛知県において2010年4月から2011年3までに感染症発生動向調査の病原体定点で採取された散発性感染性胃腸炎患者の糞便および吐物、計324検体中189検体(58.3%)から胃腸炎ウイルスが検出された。検出ウイルスの多くはNoV GIIであり、GII. 4からGII. 3へと流行遺伝子型の変化を認めた。

③ 広島県で検出されたNoV GII. 4のVP1領域特定7部位のアミノ酸変異を調査したところ、複数事例で確認された変異タイプは2つに分類され、1つは以前のシーズンとは異なる変異タイプであった。

D. 考察

1. 食品からのウイルス検出法の開発・標準化

(1) パンソルビン・トラップ法の実用化およびその問題解決に向けた検討

ポテトサラダと焼きそばについて、NoV GII/4の添加回収試験を行ったところ、NoV GII/4特異的ウサギ抗血清と汎用的なガンマグロブリン製剤(Gammagard)の比較では前者の回収率が有意($p < 0.05$)に高かった。しかし、ガンマグロブリン製剤は入手の容易さと汎用性に利点があり、通常の検査対応としてはガンマグロブリン製剤を、精度管理にはウサギ抗血清を用いるなどの活用が可能と考えられる。

パンソルビンの入手難を想定し、自作品を作製し回収率を市販品と比較したところ同等の回収率が得られた。防腐剤

(アジ化ナトリウム)存在下で1年間は保存可能であり、大量に作製することで、市販品の在庫切れ等の問題に対応することができると考えられる。さらに、市販パンソルビンでは食品1検体あたり約2,000円が必要であるが、自作することで数十円にまでコストを圧縮することができるため費用対効果の面でも有利である。

一方、パンソルビンの本体である黄色ブドウ球菌の遺伝子による影響と思われるnested PCRにおける検出感度の問題が浮上したので、来年度問題解決に取り組む予定である。

(2) パンソルビン・トラップ法の食中毒事例への適用

2012年9月に大阪府堺市の幼稚園で発生した食中毒事例においてパンソルビン・トラップ法による食品検査を実施した結果、「そら豆の煮物」と「こんにゃくのキンピラ」からNoV GIとNoV GIIを検出することができた。食品からのウイルス検出法の確立は食中毒事例の原因究明、食中毒予防を含めた食の安心・安全に大きく貢献するものと考えられる。また、食材の調理製造過程における衛生基準の遵守・徹底の指標にも貢献できると思われる。検出系をマニュアル化し全国に検査方法の普及を計ることが必要である。

(3) 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

キメラ型NoV検出用に新たに設定したプライマーセットは、SKシリーズを用いたコンベンショナルなRT-PCRの代替として使用可能であり、かつ、キメラウイルスの解析、検出にも対応できると考え

られた。しかし、今回の結果は、代表的な遺伝子型に対する試験結果であり、混合感染事例や稀な遺伝子型に対しては今後検討を行う必要がある。また、GIVについては遺伝子型が一種類であり、研究の対象としていないため、新たに構築した検出システムでは、GIVは検出できない可能性がある。

(4) 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 微粒子濃縮法について対象食品を増やし回収率を調べた。野菜類では、冷凍ラズベリーを除き効率良くウイルスが回収されたが、穀物類や食肉・魚介類ではフライドポテトや焼鮭など一部の食品で回収率が低かった。ミートソーススパゲティではイソアミルアルコールで処理することにより回収効率が改善された。今後も低回収率の食品における処理方法の改良を継続する予定である。

(5) 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

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 フェ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、感染性フェ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ェージ同定のためのリアルタイム PCR 法を検討した。プラーク法による F フェージの感染価が予期した値より低いことおよび検査結果に乖離が認められたことなどから、検査法のさらなる検討とともにデータの蓄積等が必要と考えられた。

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

アミノ酸配列で多重整列を作成してから個々のアミノ酸をコドンに変換する方法によって得られたコドン配列の多重整列を用いて非同義置換速度/同義置換速度比を推定すると、比が過大推定され、その要因としてアミノ酸配列の多重整列作成における誤り、3 塩基を単位としない挿入・欠失によるアミノ酸配列と塩基配列それぞれで作成された多重整列の不整合が考えられた。

(2) サボ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

新たに SaV 5 株の VLP の作製に成功した。SaV は NoV と比較して VLPs の収穫量が少なくとも 1/10 程度低いことから、VLPs の大量発現系の確立という課題は残っているものの、実用的な SaV の迅速抗原検出系および食品からの SaV 濃縮法の開発の可能性が見えてきたと考えられる。特に遺伝子群特異性抗体が得られたこと

からカクテル抗体法を用いることにより、ELISA 法あるいはイムノクロマト法などによる検出系の構築は可能と考える。今後、詳細な抗原解析やエピトープマッピングを行い、抗原検出系を構築し、流行疫学、早期発見および早期予防に寄与したい。

(3) A 型肝炎ウイルス検出 nestedPCR 法の改良

新たに設定したプライマーセットによる RT-PCR の検出率および分子疫学的解析能の改善を確認することができた。これにより感染源や感染経路の特定、患者間の疫学的関連性の把握等の分子疫学的解析の精度向上が図れるものと思われる。特に韓国、中国を含めアジア諸外国は A 型肝炎が多発しており、それらの国からの HAV の侵入が懸念されることから、それらの国の分離株との比較解析は重要である。新しい増幅部位はこれらの国の解析部位も含んでおり、150bp 程度しか比較できなかった従来の状況も大幅に改善できると期待される。

(4) E 型肝炎ウイルス genotype5 (G5) および 6 (G6) のウイルス様中空粒子の作製と抗原性解析

G5 と G6 の HEV の抗原性は G1, G3 および G4 HEV と非常に類似することが明らかになった。G5 と G6 HEV-LPs は優れた免疫原性を持ち、ワクチン開発の有用な材料になると考えられる。また、ネイティブな粒子と類似する大きな G5 と G6 HEV-LPs は HEV の構造解析に非常に有用である。

(5) 食品媒介ウイルスの簡便な同時検出法の開発

蛍光 RT-マルチプレックス PCR 法の PCR

の反応試薬として AmpliTaq Gold Fast PCR Master Mix, UP を用いることにより Multiplex PCR Assay Kit と同感度、反応時間は半分以下となり、迅速化が図れた。AiV, BoV, PeV の蛍光 RT-マルチプレックス PCR 法の有用性も確認できたことから、より多くの胃腸炎ウイルスの同時検出が可能になった。

また、SaV, AstV, ARV, CRV, EA dV, EnV の 6 種類の腸管系ウイルスを 2 つのマルチプレックスリアルタイム PCR の同時検出系も構築し、これらのウイルスの検索に要する時間を削減することができた。食中毒などの緊急時対応に非常に効果的な検出系であると考えられる。

(6) ふきとり検体からの高感度なウイルス検出法の開発

BSA, PEG6000 および NaCl を使用した水性二相分配法で清浄な液体に存在する NoV を高感度に回収することができた。BSA はウイルスの培養を行っている施設では常用されている試薬であり、器具や施設のふきとり検体などの比較的清浄な検体の検査に活用できると思われた。

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 等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 亜型は過去 5 シーズンにわたり大流行したため、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。

これまで、GII. 4 でキメラウイルスが頻

繁に発生していることを報告した。昨年、流行したGII.2, GII.3も同様にキメラウイルスであり、ゲノム組換え点は複製蛋白質と構造蛋白質の境界領域に存在した。これにより新たな性質(免疫逃避能と増殖能)を獲得した変異ウイルスが発生し、その中で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、ヒト集団内で広がったと推察している。

また、NoVやSaVの主要抗原となるカプシド蛋白質の抗原部位や機能部位を推定する新しい手法の開発を目的として、1D-3D プロファイル法等による解析を行った結果、1D-3D プロファイルによりSaVカプシド蛋白質を解析した結果、比較的小さい共分散を示す部位が、D365, F383, I428, S470の周辺のアミノ酸座位に見られた。これらの部位が抗原部位や機能部位である可能性が考えられる。これらの部位のうち、F383周辺は大きいエントロピーを示し、抗原部位であると推定された。一方、D365, I428, S470周辺部位のエントロピーは小さく、アミノ酸がより保存されていたことから、機能部位であると推定された。D365とI428周辺は感染受容体などとの結合部位、S470周辺は二量体-二量体結合に関与する部位であると推察された。

(2) 食品、動物、環境の汚染実態調査

大阪市の調査で2011年12月初旬に市販されていた生食用カキの約38%から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。一方、富山県の調査で6月採取の岩ガキからNoVが検出された。岩ガキの出荷時期は春から夏であ

り、NoVの流行時期である冬とはずれているものの、NoVを蓄積していることが確認された。また、岩ガキは真ガキよりも生食されることが多い食材である。2011年6月に他自治体で富山県産の生岩ガキを原因とする食中毒事例が発生したとの情報があり、今回調査でNoV陽性となった時期と一致していた。

青森県で合流水と分流水のNoVのウイルス量を比較した結果、分流水がNoVは冬季に、AstVは年間を通じ多く検出された。合流水は家庭排水の他に雨や雪等も含まれ、最終処理施設へ運ばれるため、天候の影響を受けやすく、患者発生状況の把握には適切ではないと考えられた。一方、分流水は家庭排水のみで、天候等に左右されにくいため、ウイルス濃度の変動が少なく、発生動向の把握に有効であると考えられた。

堺市の調査で、臨床検体からSaVの検出は少なく、AstV, AiVの検出はなかったが、環境検体ではそれらが高頻度に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、河川上流地域の放流水が集約する河口部にカキを垂下し胃腸炎ウイルスをモニタリングすることにより、上流域で発生している感染性胃腸炎の起因ウイルスの動向を推測することが可能と考えられた。

佐賀県の調査でも下水のサーベイランスにより上流域におけるNoVなどの感染や流行の発生動向を推測できる結果が