

201234010A

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24年度 総括・研究分担報告書

研究代表者 野田 衛

平成25(2013)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 24 年度 総括・研究分担報告書

研究代表者 野田 衛

平成 25 (2013) 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. 堺市におけるキメラ型ノロウイルスの流行解析
田中 智之 他 ----- 29
2. パンソルビン・トラップ法によって食品検体から検出されたノロウイルスの遺伝子解析法の開発
斎藤 博之 ----- 35
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 ----- 49
4. 国内で流行するノロウイルスの全ゲノム解析
佐藤 裕徳 ----- 53
5. サポウイルスカプシド蛋白質の動的性質
横山 勝 ----- 57
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 ----- 61
7. サポウイルス抗原検出系開発のための抗原パネルの作成
村上 耕介 他 ----- 65
8. 日本における 2012 年の A 型肝炎の分子疫学的解析
石井 孝司 他 ----- 69
9. E 型肝炎ウイルスに対するラットの感受性
李 天成 他 ----- 73
10. パンソルビントラップ法の多機関評価試験結果
野田 衛 他 ----- 77

III. 研究協力報告書

1. 研究協力者総括報告書
田中 智之 他 ----- 113
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ー冷凍および生鮮果実からのウイルス回収ー
篠原 美千代 他 ----- 121
3. 細胞破碎法によるカキ中腸腺からのノロウイルス (NoV) 抽出方法の検討
植木 洋 他 ----- 127
4. ノロウイルス汚染ステンレス板からのふきとりによるウイルスの回収に関する検討

	田村 務 他 -----	131
5.	集団胃腸炎事例を対象とした胃腸炎ウイルスの検索	
	吉澄 志磨 他 -----	135
6.	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 -----	145
7.	カキ関連食中毒疑事例からのエンテロウイルス、パレコウイルス、ボカウ ウイルスの検出および国産食用カキのノロウイルス・A型肝炎ウイルス汚染 調査	
	入谷 展弘 他 -----	151
8.	愛知県における食品媒介ウイルスの検出状況	
	小林 慎一 他 -----	157
9.	愛媛県で検出されたノロウイルスの分子疫学的解析と 2012/2013 シーズン に検出されたノロウイルス GII.4 変異株について	
	山下 育孝 他 -----	163
10.	パンソルビン・トラップ法による食品からのノロウイルス遺伝子の検出－ 弁当屋を原因施設としたノロウイルス集団食中毒事例－	
	飯塚 節子 他 -----	175
11.	感染性胃腸炎患者糞便に対するサポウイルス検出系の比較	
	飯塚 節子 他 -----	181
12.	蛍光 RT-マルチプレックス PCR 法による下痢症ウイルスの検出と解析	
	重本 直樹 他 -----	187
13.	Multiplex real-time PCR を利用した腸管系ウイルス検査の検討	
	小和田 和誠 他 -----	195
14.	終末処理場の処理前の下水におけるノロウイルス等汚染実態調査	
	三上 稔之 他 -----	201
15.	富山県におけるノロウイルス・サポウイルス検出状況	
	名古屋 真弓 他 -----	209
16.	環境と臨床検体からみた下痢症ウイルスの動態	
	内野 清子 他 -----	219
17.	下水道流入水及び放流水からのウイルス検出について	
	世良 暢之 他 -----	225
18.	カキ関連食中毒事例および下水からの下痢症ウイルスの検出	
	森田 晴美 他 -----	229
19.	カキ中のヒト糞便由来 F 特異 RNA 大腸菌ファージの検出法の検討	
	山本美和子 他 -----	235
20.	熊本県におけるイノシシ、シカ及びブタの E 型肝炎ウイルス汚染実態調査 － 平成 24 年度 －	
	原田 誠也 他 -----	241

21.	サポウイルス VLPs に対する新規単クローン抗体の作製とその解析		
	北元 憲利 他	-----	247
IV.	研究成果の刊行に関する一覧	-----	253

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 24 年度 総括研究報告書

研究代表者 野田 衛

平成 25 (2013) 年 3 月

平成 24 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

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

一般食品からのウイルス検出法として開発されたパンソルビン・トラップ法において逆転写反応専用プライマーを用いて逆転写反応を行うことで、検出遺伝子のシーケンス解析が可能となり、島根県で発生した実際の食中毒事例で活用することができた。パンソルビン・トラップ法について多機関評価試験を実施し、その有用性と課題を検討した。一方別の食品検査法である ACP 微粒子濃縮法で回収率の低かった冷凍ラズベリーからのウイルス濃縮に 3%Beef extract 加 PBS を用いることで回収率は大きく改善された。簡便なカキからのウイルス検査法である細胞破碎法によるカキ中腸腺からのノロウイルスの回収は、同じ破碎条件では低い乳剤濃度で、同じ添加蒸留水量では低速の破碎で高い回収率が得られた。カキ中の F フェージプラーク数は、リアルタイム PCR 法から推定される量より低い一方、リアルタイム PCR 法による II 群フェージの検出はノロウイルス GII あるいはサポウイルスの検出とよく一致し、F フェージはヒト糞由来ウイルスの汚染指標となり得る可能性が示唆された。

(2) ウイルス性食中毒の検査体制の強化

ノロウイルス迅速遺伝子型分別システムの開発の一環として、ノロウイルスのゲノムがコードする構造蛋白質、非構造蛋白質の進化で生じたアミノ酸置換に働いた自然選択圧を検出できる方法を開発した。ノロウイルスのポリメラーゼ領域から N/S 領域を含む VP1 領域の全長をカバーする約 3.2kb を増幅する第二世代のプライマーセットを開発した。サポウイルスの迅速検査法開発に向けて、新たにサポウイルス 2 株の VLP の作製に成功するとともに、GIV (Yakumo) VLP を免疫原としてサポウイルスのすべての遺伝子群に交叉する抗体および GIV 特異的モノクローナル抗体抗体を得た。迅速な食中毒検査を確立するために、蛍光マルチプレックス RT-PCR およびマルチプレックスリアルタイム PCR による複数ウイルスの同時検出系の有用性を実際の食中毒事例等に適

応し検証した。拭き取りからのウイルス回収法を確立するために、アルブミンとサラダ油が含まれるノロウイルス液を汚染させたステンレス板からのウイルスの回収を検討した結果、抽出用緩衝液に界面活性剤を添加することで回収率が向上した。サポウイルス検出において、新規法は従来法より高い検出率を示したが、アストロウイルス 1 型と交差にも反応する例が認められた。サポウイルス GenogroupingPCR 法による群別はシークエンズに基づく群別と完全に一致した

(3) 食品、動物、環境の汚染実態調査と分子疫学的研究

食品等のウイルス汚染リスクを把握するため汚染実態調査を継続した。生食用市販カキ 9 ロット中 2 ロット (22.2%) からノロウイルスが検出された。岩ガキ 63 検体からノロウイルスおよびサポウイルスは検出されなかった。下水からは患者の発生と一致し、多くの胃腸炎ウイルスが検出され、下水のサーベイランスはノロウイルス等の腸管系ウイルス浸淫状況を把握する有効な手段となり得ることが示された。その一方で、下水からは高頻度に検出されるが、患者からはあまり検出されないウイルスが認められ、不顕性感染が高頻度の存在していることが示唆された。特にノロウイルスでは、GI.4 のように患者からの検出は少ないが、下水からは高頻度に検出される遺伝子型が認められ、遺伝子型により不顕性感染率 (病原性) に違いがあることが示された。下水処理場の合流水と分流水のノロウイルス等のウイルス量を比較した結果、分流水の方が 10~100 倍高い値を示した。イノシン及びシカから E 型肝炎ウイルス遺伝子は検出されなかったが、と畜されたブタの約 1% から、と畜検査で合格となった肝臓の 2.5% から E 型肝炎ウイルス遺伝子が検出され、ブタ肝臓の E 型肝炎ウイルス汚染リスクが示唆された。養豚別の E 型肝炎ウイルス遺伝子陽性率は 9.1% であった。ラット E 型肝炎ウイルスはラットに感染するが、ヒト由来 E 型肝炎ウイルスはラットに感染しないことを明らかにした。

変異株の検出や診断法、予防法の開発等につなげるため、検出ウイルスの遺伝子解析を実施した。2006/07~2010/11 シーズンに検出された GII.4 2006b 変異株 258 株を解析した結果、一般には抗原として多様性が高いと想定されているカプシド蛋白質において、塩基配列の多様性は増加するものの、アミノ酸配列はよく保存されていた。2004/05 シーズンから 2012/13 シーズンまで検出されたノロウイルスの解析を行った結果、複数のキメラウイルスが検出され、その出現とノロウイルスの流行に関連性が認められた。2011/12 シーズンは GII.4 2006b が主流であったが、2012/13 シーズンは 2012 年に出現した Sydney/NSW0514/2012/AU に類似の GII.4 の新しい変異株 (2012 変異株) が主流であった。解析した多くのノロウイルスは ORF1 と ORF2 の間で、遺伝子型内あるいは遺伝子型間で組み換えを起こしたキメラウイルスであった。サポウイルスの P2 ドメイン上に、抗体等と結合しやすく抗原部位や機能部位であると考えられるゆらぎが適度に大きい部位を特定した。2012 年に検出された A 型肝炎ウイルス 28 株は遺伝子型 IA 21 株、IB 2 株、IIIA 4 株、IIIB 1 株に分類された。IA は従来から

国内に存在するタイプで、2010年春季の多発の主要原因であった型は検出されなかった。

(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サポウイルスを検出することができた。ノロウイルス以外の胃腸炎ウイルスの食中毒事例への関与を明らかにするために、食中毒事例や感染症事例について分析した。その結果、ノロウイルス以外に二枚貝関連事例からサポウイルス、アイチウイルス、アストロウイルス、エンテロウイルス、二枚貝非関連事例からサポウイルス、A群ロタウイルス)が検出された。特に、サポウイルスとA群ロタウイルス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、ノロウイルス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ノロウイルス量は、患者と不顕性感染調理従事者者で大差はなかった。

研究分担者

田中 智之	堺市衛生研究所	永野 美由紀	センター 同上
斎藤 博之	秋田県健康環境センター	秋場 哲哉	同上
	—	林 志直	同上
鈴木 善幸	名古屋市立大学	入谷 展弘	大阪市立環境科学研究所
佐藤 裕徳	国立感染症研究所		所
横山 勝	同上	改田 厚	同上
片山 和彦	同上	阿部 仁一郎	同上
岡 智一郎	同上	山元 誠司	同上
村上 耕介	同上	久保 英幸	同上
石井 孝司	同上	小和田 和誠	福井県衛生環境研究センター
李 天成	同上		センター

研究協力者

内野 清子	堺市衛生研究所	山本 希	同上
三好 龍也	同上	平野 映子	同上
芝田 有理	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
吉澄 志磨	北海道立衛生研究所	山本 美和子	広島市衛生研究所
後藤 明子	同上	田中 寛子	同上
石田 勢津子	同上	藤井 慶樹	同上
森 功次	東京都健康安全研究センター	京塚 明美	同上
		石村 勝之	同上
		植木 洋	宮城県保健環境センター

	一	齋藤 幸一	同上
川端 淑子	同上	世良 暢之	福岡県保健環境研究所
篠原 美千代	埼玉県衛生研究所	石橋 哲也	同上
島田 慎一	同上	中村 朋史	同上
内田 和江	同上	吉富 秀亮	同上
富岡 恭子	同上	小林 慎一	愛知県衛生研究所
鈴木 典子	同上	原田 誠也	熊本県保健環境科学研 究所
貫洞 里美	同上		
小川 泰卓	同上	大迫 英夫	同上
岸本 剛	同上	吉岡 健太	同上
重本 直樹	広島県立総合技術研究 所保健環境センター	岩切 章	宮崎県衛生環境研究所
		片岡 紀代	同上
東久保 靖	同上	吉崎 佐矢香	同上
久常 有里	同上	脇田 隆宇	同上
飯塚 節子	島根県保健環境科学研 究所	網 康至	同上
		須 崎百合	同上
北元 憲利	兵庫県立大学	溝口 嘉範	岡山県環境保健センタ ー
山下 育孝	愛媛県立衛生環境研究 所	上間 匡	国立医薬品食品衛生研 究所
青木 里美	同上		
四宮 博人	同上	(順不同)	
三上 稔之	青森県環境保健センタ ー		
		A. 研究目的	
筒井 理華	同上	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	
東海林 彰	同上		
古川 紗耶香	同上		
名古屋 真弓	富山県衛生研究所		
稲崎 倫子	同上		
板持 雅恵	同上		
嶋 一世	同上		
堀元 栄詞	同上		
小渕 正次	同上		
滝澤 剛則	同上		
森田 晴美	岩手県環境保健研究セ ンター		
高橋 雅輝	同上		

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：ノロウイルス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・トラップ法によって食品検体から検出されたノロウイルスの遺伝子解析法の開発

パンソルビン・トラップ法で得た cDNA のシーケンス解析を可能とするために検査法の改良を行った。GII/4 あるいは GI/4 のノロウイルスを汚染させた焼きそばあるいはポテトサラダから、パンソルビン・トラップ法でウイルスを回収後、逆転写反応専用のプライマーで逆転写反応を行い、cDNA を得た。nested PCR 法で増幅後、ゲル電気泳動で増幅 DNA の有無を確認した。増幅 DNA が認められた場合は、DNA をゲルから切り出した後、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定した。また、1st PCR 産物を鋳型として、リアルタイム PCR を行い、ノロウイルスの検出の有無を調べた。

(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 2012 年 3 月に島根県で発生したノロウイルス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) パンソルビントラップ法の多機関評価試験

国立医薬品食品衛生研究所(国衛研)でノロウイルス GII 汚染食品を作製し、研究協力を得た 11 地方衛生研究所(地研)で共通のプロコールに従い、食品からのウイルスの回収から逆転写反応までを実施した。その後、各検査機関が通常実施している方法に従い、リアルタイム PCR、nested PCR および nested リアルタイム PCR を実施した。nested PCR では、シーケンス検査で増幅 DNA がノロウイルス

由来であることを確認した。結果は国立衛研で集計分析した。多機関評価試験の結果、検査法に問題点が認められたため、プロトコールの変更を行い、研究協力が得られた8地研で再度試験を実施した。

(4) 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(組み換え型)のノロウイルスの迅速な分析・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、GII/4 2012 変異株の全塩基配列を次世代シーケンサーで決定した。Norovirus scientific committee によって示される新規 genotyping 法に完全に対応した、ポリメラーゼ領域から N/S 領域を含む VP1 領域の全長をカバーする約 3.2kb を増幅する第二世代のプライマーセットを設計し、その有用性を検討した。

キメラウイルス検出、解析に対応する GI および GII の標準プラスミドは、GI.1 NV68 prototype Norwalk virus (accretion number; M87661) または GII.4 Sagal (accretion number; AB447456) のゲノム全長塩基配列に点突然変異変異を導入後 pUC ベクターに組み込んで作成した。

(5) 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開発中の、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、

低回収率の食品のうち、海外でしばしば広域食中毒の原因食品となっている冷凍ラズベリーを中心に、冷凍または生鮮果実からのウイルス回収方法の改良を検討した。

(6) カキからのウイルス検出法の改良開発

迅速簡便なカキからのウイルス検出法を開発するために、破碎法における乳剤濃度および遠心条件について検討した。

(7) 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

カキにおけるノロウイルス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、カキ中腸腺中の 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、ノロウイルスおよびサポウイルスの遺伝子検出結果と比較し、その関連性を調べた。

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

ノロウイルス迅速遺伝子型分別システムの開発を目的として、H3N2 亜型ヒトインフルエンザ A 型ウイルスがコードするヘマグルチニン遺伝子の塩基配列(2,043 株)を用いて、正の自然選択、負の自然選択が働いたかあるいは自然選択が働かなかったかを、その後の進化で逆向きの置換に働いた自然選択圧を検出することにより推測した。

(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

サポウイルス抗原検出法の開発を目的として、各種のサポウイルス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) 感染性胃腸炎患者糞便に対するサポウイルス検出系の比較

サポウイルスの検出系の評価を行うため、従来法と新規法の 2 つの nested RT-PCR 系について、食中毒事例を含む感染性胃腸炎患者検体を用いて比較した。また、サポウイルスの遺伝子群 (genogroup) を増幅産物の長さの違いによって判定する nested RT-PCR 系 (genogrouping 法) の検出率を従来法と比較した。

(4) E 型肝炎ウイルスに対するラットの感受性

E 型肝炎ウイルスに対するラットの感受性を調べるために、遺伝子型 1, 3, 4 (G1, G3, G4) E 型肝炎ウイルスおよびラット E 型肝炎ウイルスをラット尾静脈内から接種し、経時的に血液と糞便を採取した。ウイルス遺伝子、ウイルス特異抗体、ALT/AST を測定してウイルスの感染の有無を評価した。ラット E 型肝炎ウイルスの感染ルートを同定するため、ラット E 型肝炎ウイルス汚染ケージで一週間飼育した後、ラット E 型肝炎ウイルス非汚染ケージに移し、3 か月観察した。

(5) 食品媒介ウイルスの簡便な同時検出法の開発とその応用

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 RT-マルチプレックス PCR 法によるノロウイルス、サポウイルス、アストロウイルス、アイチウイルス、ボカウイルス、パレコウイルス、A 群ロタウイルス、C 群ロタウイルスおよびアデノウイルス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、腸管アデノウイルス、エンテロウイルス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、ふきとり方法を検討した。アルブミンとサラダ油を含むノロウイルス液を汚染させたステンレス板から、市販ふきとりキットあるいはガーゼによりウイルス液を回収後、BSA-PEG 水性二相分配法で濃縮しウイルスの回収率を比較した。

3. 食品、動物、環境の汚染実態調査と分子疫学的研究

(1) 国内で流行するノロウイルスの全ゲノム解析

2006/07~2010/11シーズンに検出された GII.4 2006b 258 株を対象として、多様性の解析および選択圧の種類や作用部位の解析を行った。多様性の解析では、配列集団の遺伝距離の算出は MEGA を用い、

アミノ酸配列の個々のサイトの多様性は情報エントロピーを指標として定量化した。選択圧の種類や作用部位の解析では、コドンの同義置換/非同義置換率の算出、中立性の検証などの解析はMEGA または自作のプログラムを用いた。

(2) 堺市におけるキメラ型ノロウイルスの流行解析

ノロウイルスにおけるキメラウイルスの存在を把握するために、2004/05シーズンから2012/13シーズンまでに堺市で検出されたノロウイルス 197株を対象とし、ポリメラーゼ領域とN/S ドメイン領域の遺伝子解析を行った。

(3) サポウイルスカプシド蛋白質の動的性質

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、サポウイルスカプシドの初期構造を構築後、ネコカリシウイルスカプシドを鋳型として、Amber10 の pmemd モジュール等を用いて、生理的条件下で分子動力学計算を行った。得られたトラジェクトリーを用いて、AmberTools の ptraj モジュールにより、RMSD (root mean square deviation: 平均二乗偏差), RMSF (root mean square fluctuation: 根平均二乗ゆらぎ), および DCCM (Dynamics Cross Correlated Motion: 動的相互相関運動) を計算した。

(4) 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、ノロウイルス、サポウイルス、エンテロウイルス、アストロウイルス、アデノウイルス、アイチウイルス、

A 群ロタウイルス、C 群ロタウイルス、A 型肝炎ウイルス、E 型肝炎ウイルスの検索を実施した。

また、ブタ、イノシシおよびシカの肉、肝臓、血液を対象に E 型肝炎ウイルス遺伝子の保有状況を調査した。

(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)

(5) A 型肝炎の分子疫学的研究

2012 年に発生した A 型肝炎患者から検出された A 型肝炎ウイルス 28 株について厚生労働省通知法に従い、A 型肝炎ウイルスゲノムの構造/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) 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

ノロウイルス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、サポウイルス、アストロウイルス、アイチウイルス、A 群ロタウイルス、C 群ロタウイルス、ボカウイルス、アデノウイルス、エンテロウイルス、パレコウイルス、A 型肝炎ウイルス、E 型肝炎ウイルスの検索を実施した。

また、食品媒介事例から検出されるノロウイルス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、中学生以上の年齢層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)

(2) 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・トラップ法によって食品検体から検出されたノロウイルスの遺伝子解析法の開発

本法の nested リアルタイム PCR 法での検出感度は 35 コピー/g 程度であるが、 1.0×10^2 コピー/g 以下では、パンソルビンの本体である黄色ブドウ球菌に遺伝子に阻害され、増幅産物のシーケンス解析が困難であった。そこで、ノロウイルス GII 用の逆転写反応専用のプライマーを設計し、それを用いて得た cDNA を増幅した結果、35 コピー/g の汚染レベルまで明瞭な増幅バンドが観察され、添加ウイルス由来であることが確認された。また、検出の有無は 2nd PCR をリアルタイム PCR で行った結果とも一致した。さらにホットスタート機能を備えた酵素を用いたタッチダウン PCR による semi-nested RT-PCR により、増幅バンドが明瞭になり、検出感度が改善された。GI についても、同様の検討を行った。GI には十分な T_m を確保するために LNA 修飾を用いたプライマーを設計した。同じ配列をもつ LNA 非修飾のプライマーと比較した結果、増幅 DNA 量が増加し、その有用性が確認された。その結果 GI においても GII と同様の結果が得られた。

(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

2012 年 3 月に島根県で発生した食中毒事例において、16 検体の食品(プールしたものを含む)についてパンソルビン・トラップ法(Gammagard 使用)を適用した。PANR-GII プライマーで cDNA 合成を行った場合、nested real-time PCR で 4 検体

に蛍光シグナルが認められ、このうち3検体が nested PCR でノロウイルス GII の位置にバンドが認められた。これらについてダイレクトシーケンスを行った結果、2 検体はノロウイルス GII/4、1 検体はノロウイルス GII/2 であった。

(飯塚研究協力報告書)

(3) パンソルビントラップ法の多機関評価試験

パンソルビントラップ法の開発を行った機関を除き、他の 10 機関の検査結果は必ずしも満足できる結果ではなく、特にリアルタイム PCR 法の検出率が低い傾向にあった。DNase 処理を省き逆転写反応を厚生労働省の通知法に準じた方法に変更し、またリアルタイム PCR に使用するマスターミックス液を変更し、再試験を実施した結果、多くの検査機関で検査結果の改善が認められた。

(野田研究分担報告書)

(4) 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

GII/4 2012 変異株は、GII/4 2004 と比較して、全長に渡り変異が点在し相同性は 88% であった。コンベンショナル RT-PCR, real-time PCR, 第一世代 genotyping primer, 新規にデザインした第二世代 genotyping primer のプライマー、プローブ部位に影響はなかった。第二世代のプライマーセットは、便中に 10^5 copies/g 以上の RNA 量、試験した全ての遺伝子型で増幅産物が得られ、検出率は第一世代と比較して約 20% 程度向上した。GI, GII それぞれのコントロールプラスミドおよび T7 RNA polymerase を用いて、

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 シリーズを用いたコンベンショナルな RT-PCR とほぼ同等の感度であった。

(片山研究分担報告書)

(5) 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

冷凍ブルーベリーの回収率は、同食品の処理に適していると報告されている 3% Beef extract (BE) 加 Tris-glycine 液よりも、3% BE 加 PBS を用いる方が高かった (56%)。3% BE-PBS を洗浄液として、冷凍あるいは新鮮なブルーベリー、ストロベリー、パイナップルの回収率を調べた結果、いずれにおいても効率よくウイルスが回収された (23~185%)。

(篠原研究協力報告書)

(6) カキからのウイルス検出法の改良開発

中腸腺乳剤を作製する際に添加する蒸留水の量によるノロウイルスの検出率を比較した結果、これまで実施してきた添加蒸留水量 1ml, 4, 500rpm・60 秒の破碎では 16.3% であったのに対し、2.5ml, 3, 000rpm・10 秒の破碎では 58.3% であった。

一定破碎条件 (4, 500rpm・60 秒) において乳剤濃度とノロウイルス遺伝子の検出率は高い負の相関性 ($R^2=0.9946$) を示し、低い乳剤濃度で高い回収率が得られた。

(植木研究協力報告書)

(7) 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

カキ中からの F-フェージは、51 検体中プラーク法では 1 検体のみ陽性であったが、リアルタイム PCR 法ではⅡ群フェージは 25 検体、Ⅲ群フェージは 44 検体が陽性であった。Ⅱ群フェージとノロウイルス GII の一致率は 80.4%、Ⅱ群フェージとサポウイルスの一致率は 78.4%であった。また、Ⅱ群フェージとノロウイルス GII のコピー数の相関係数は 0.86 と正の相関がみられた。

(山本研究協力報告書)

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

H3N2 亜型ヒトインフルエンザ A 型ウイルスの糖鎖付着部位産生後の進化において、糖鎖付着部位を産生したアミノ酸置換と逆向きのアミノ酸置換には負の自然選択圧が働いていることが統計的に支持され、糖鎖付着部位産生は H3N2 亜型ヒトインフルエンザ A 型ウイルスの進化において適応的であったことが示唆された。

(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 2 株 (GI. 3, GI. 7) の 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。電子顕微鏡観察により、これら VLPs はサポウイルスに特徴的な形態を有した。VLPs の収量は培養上清 約 300 mL あたり、GI. 3 が 18 μ g, GI. 7 が 4 μ g であった。

(村上研究分担報告書)

サポウイルスに対する新しいモノクローナル抗体として、Y2A4 および Y1A8 を得た。Y2A4 はすべての遺伝子群の VLPs と反応し、Y1A8 は GIV のみと特異的に反応した。

GIV 特異的 Y1A8 と、既存の GI 特異的 616, GII 特異的 1803, および GV 特異的 1496 をカクテルしたものおよび抗サポウイルス抗血清を固相化抗体とし、各 VLPs を反応後、捕捉抗体としてビオチン化抗体 Y2A4 を添加した結果、すべての VLPs と反応した。

(北元研究協力報告書)

(3) 感染性胃腸炎患者糞便に対するサポウイルス検出系の比較

食中毒事例の患者 24 検体および感染性胃腸炎患者 514 検体のうち、従来法で 36 検体、新規法で 49 検体がサポウイルス陽性となった。genogrouping 法は従来法とほぼ同じ検出数であった。リアルタイム RT-PCR 法では食中毒患者検体は従来法および新規法で陽性の 12 検体のうち 11 検体が陽性となり、感染性胃腸炎患者検体はいずれかの方法で陽性となった 38 検体すべてでリアルタイム RT-PCR 法での定量が可能であった。PCR 産物の遺伝子解析の結果、新規法で陽性となったうち、5 検体はアストロウイルス 1 型であることが明らかとなった。その増幅産物はサポウイルスの Nested PCR 産物 (約 420bp) より若干短い位置 (約 400bp) にバンドが見られた。

(飯塚研究協力報告書)

(4) E 型肝炎ウイルスに対するラットの感受性

G1, G3, G4 E 型肝炎ウイルスを接種ラットから抗 E 型肝炎ウイルス IgG, IgM 抗体および E 型肝炎ウイルス RNA は検出されず, ALT の上昇もみられなかった。ラット E 型肝炎ウイルスを接種したラットでは接種後の 3 週目から抗ラット E 型肝炎ウイルス IgG と IgM 抗体が検出され, 便中からラット E 型肝炎ウイルス RNA が検出された。また, ラット E 型肝炎ウイルス汚染ケージで飼育されたラットから抗ラット E 型肝炎ウイルス抗体及びラット E 型肝炎ウイルス RNA が検出されたことから, ラット E 型肝炎ウイルスは糞口経路によって伝播することが示された。しかし, すべてのラット E 型肝炎ウイルス感染ラットで ALT の上昇は認められなかった。

(李研究分担報告書)

(5) 食品媒介ウイルスの簡便な同時検出法の開発

昨年までに開発したノロウイルス G I, G II, サポウイルス, アストロウイルス, アイチウイルス, ボカウイルス, パレコウイルスに加え, 新たに, A 群ロタウイルス, C 群ロタウイルスおよびアデノウイルスを加え, 10 種の検出系を 3 本の反応系で検出するの蛍光 RT-マルチプレックス PCR を確立した。本法を用いて, 2010/11~2012/13 シーズンの集団発生事例 (37 事例 112 検体) を検査したところ, ノロウイルス G II が 31 事例, 腸管アデノウイルス, A 群ロタウイルス, サポウイルスが各 1 事例から検出された。6 事例からは複数のウイルスが検出された。

(重本研究協力報告書)

6 種類 (サポウイルス, アストロウイルス, C 群ロタウイルス, A 群ロタウイルス, アデノウイルス, エンテロウイルス) のウイルスを 2 つの反応系で検出するマルチプレックスリアルタイム PCR の有用性を検討した。2012 年の感染性胃腸炎患者糞便 26 検体中 17 検体および食中毒等の集団発生 13 事例 149 検体中 2 事例 2 検体からウイルスを検出した。2009 年 4 月以降の小児散発例患者や食中毒等の集団発生の患者から本法で検出されたウイルスの遺伝子型を調べ, 本法により様々な遺伝子型のウイルスの検出が可能であることを確認した。

(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

アルブミンとサラダ油が含まれるノロウイルス液のステンレス板からの回収において, 市販のふきとりキットでは回収率が 0.1% と低かったが, 抽出用緩衝液に界面活性剤を添加することで, 回収率が 0.8% に向上した。滅菌ガーゼによるふきとりでも, 回収率は 4% と低かった。

(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) 国内で流行するノロウイルスの全ゲノム解析

国内の GII.4 2006b 変異株 258 株について全ゲノム解析等を実施した結果, 塩基配列の多様度は年々増加したが, 変異の大半は同義置換であり, アミノ酸変異は少なく, アミノ酸置換が強く抑制され

ていることがわかった。その結果、一般には抗原として多様性が高いと想定されているカプシド蛋白質においても、GII. 4 2006b 変異集団ではよく保存されていた。(佐藤研究分担報告書)

(1) 堺市におけるキメラ型ノロウイルスの流行解析

2004/05シーズンから2012/13シーズンまでに堺市で検出されたノロウイルス197株を対象とし、ポリマーゼ領域とN/S ドメイン領域の遺伝子解析を行った結果、ORF1とORF2とで遺伝子型が異なるキメラウイルスが検出され、その出現とノロウイルスの流行に関連性が認められた。2004/05シーズンにはGII. P12/GII. 4, 2009/10シーズンにはGII. 2のGII. P16/GII. 2, 2010/11シーズンにはGII. 3のGII. P12/GII. 3, 2012/13 シーズンにはGII. Pe/GII. 4のキメラウイルスが認められた。

(田中研究分担報告書)

(2) サポウイルスカプシド蛋白質の動的性質

サポウイルスのS ドメインとP1 ドメインは複数の β シートからなるが、P2 ドメインは β -turn- β の1つのみであった。P2 ドメインのRMSFは、S ドメインやP1 ドメインに比べ大きく、約4Å~10Åの部位が5つあり、これらのゆらぎが適度に大きい部位は抗体等と結合しやすいと考えられる。

また、P2 ドメインでは、RMSD (root mean square deviation: 平均二乗偏差) の大きい部位のうち、F383を含むループやI428を含むループに注目すると、それらのループ内は正の相関運動であり、P1

ドメインとは負の相関運動を示していた。

(横山研究分担報告書)

(3) 食品、動物、環境の汚染実態調査

① 大阪市で2012年12月初旬に採取(買い上げ)した市販国産生食用カキについてノロウイルスの検索を行ったところ、9ロット中2ロット検体(22.2%)からノロウイルスが検出された。

(入谷研究協力報告書)

② 青森県において2012年1月~12月に下水処理施設で採取された18検体のうち、合流水5検体ではノロウイルスGI, ノロウイルスGII, アストロウイルスが5検体, 分流水13検体ではノロウイルスGI, ノロウイルスGIIおよびアストロウイルスが13検体, サポウイルスが7検体, エンテロウイルスが6検体, アデノウイルスが1検体から検出された。ノロウイルスGI, ノロウイルスGIIおよびアストロウイルスの合流水と分流水におけるコピー数の比較では、いずれも分流水が10~100倍程度高い値を示した。

(三上研究協力報告書)

③ 富山県において2012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水, および岩カキについてノロウイルスおよびサポウイルスの検出を行った。患者からはノロウイルスGII. 4, GII. 13, GII. 2, GII. 3, サポウイルスGI. 1など, 下水流入水からはノロウイルスGII. 4, GI. 4, GI. 6, サポウイルスGI. 1などが検出されたが, 岩ガキ63検体からはノロウイルス, サポウイルスともに検出されな

かった。2011/12 シーズンには 2009a と 2006b が、2012/13 シーズンは 2006b と 2012 が主流で、2003 年以降 12 種類のキメラウイルスが同定された。

(名古屋協力者報告書)

④ 堺市において2012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ノロウイルス等の検出を行った。ノロウイルス感染例からは遺伝子型 GII.4 が多く、2012 変異株は 10 月の臨床検体および環境検体から検出され、10 月以降急速に感染拡大した。臨床検体からは 3 種類のノロウイルス遺伝子型が検出されたのに対し、環境検体では 13 種類の遺伝子型が検出された。サポウイルス、アストロウイルス、アイチウイルスは臨床検体からの検出頻度は低かったが環境検体からは頻度高く検出された。

(内野研究協力者報告書)

⑤ 岩手県において2012年11月～2013年2月に下水処理場で採取された流入水7検体のうち、ノロウイルス GII (7 検体)、アイチウイルス、アストロウイルス、アデノウイルス(各 6 検体)、ノロウイルス GI, A 群ロタウイルス(各 4 検体)、サポウイルス、エンテロウイルス(各 2 検体)から、放流水 7 検体のうち、ノロウイルス GII(5 検体)、ノロウイルス GI, アイチウイルス、A 群ロタウイルス(3 検体)、アストロウイルス (2 検体) が検された。1 ml あたりのノロウイルスのコピー数は流入水で GI が $10^1 \sim 10^2$, GII が $10^3 \sim 10^4$, 放流水で GI が $10^0 \sim 10^1$, GII が $10^1 \sim 10^2$ オーダーで、調査期間を通じほぼ同程度検出された。

(森田研究協力報告書)

⑥ 福岡県において2下水処理場で2011年3月～2012年12月に流入水を採取し、エンテロウイルスの分離およびノロウイルスの検出を行った。エンテロウイルスではコクサッキーウイルス B 群及びエコーウイルスが主として検出された。ノロウイルスは GII 群が 2011 年は 12 月に増加しはじめ、1 月にピークを迎えた。2012 年は GII 群が 9 月以降から増加しはじめ、12 月時点でも依然として増加傾向にあった。

(世良研究協力報告書)

⑦ 熊本県においてイノシシ、シカ及びブタの E 型肝炎ウイルス検査を行ったところ、イノシシ 31 頭及びシカ 2 頭からは検出されなかったが、ブタ 305 頭中 3 頭 (1.0%) から遺伝子型 3 型の E 型肝炎ウイルス遺伝子が検出された。検体別にみると、血液では 225 頭中 1 頭 (0.4%) 及びと畜検査で合格となった肝臓では 80 頭中 2 頭 (2.5%) であり、血液の陽性例と肝臓陽性の 1 例は同一養豚場由来であった。養豚場別では、22 養豚場中 2 養豚場 (9.1%) のブタから E 型肝炎ウイルスが検出された。

(原田研究協力者報告書)

(4) A 型肝炎の分子疫学的研究

2012 年の患者から検出された A 型肝炎ウイルス 28 株は系統樹解析により遺伝子型 IA 21 株, IB 2 株, IIIA 4 株, IIIB 1 株に分類された。野田市でみられた家族内感染事例(6 人発症)は、日本に常在する IA 株 (IA-1) によると考えられた。2010 年春季の A 型肝炎多発の主要な原因となった株は 2012 年上期には検出されなかつ