

た。

(石井研究分担報告書)

#### 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

① 東京都において2012年1月～12月に発生した胃腸炎集団発生 563 事例のうち 356 事例(63.2%)からウイルスが検出され、そのうち 335 事例はノロウイルス、28 事例(7.9%)はその他のウイルスが関与した。サポウイルス検出事例は低年齢層の施設内で発生する集団胃腸炎のみでなく、成人年齢層における食中毒および食中毒疑い事例にも関与していることが確認された。

(森研究協力報告書)

② 大阪市において 2001 年 1 月～2004 年 11 月の期間に発生し、昨年度までにノロウイルスを含む 8 種類のウイルス検索を実施したカキの喫食を伴う食中毒疑事例について、エンテロウイルス、パレコウイルス、ボカウイルスの検索を行った。その結果、エンテロウイルスが 1 事例(2.2%) 5 検体(3.0%)から検出され、パレコウイルスおよびボカウイルスは検出されなかった。

(入谷研究協力報告書)

③ 北海道において 2007 年 10 月から 2012 年 8 月までに発生した集団胃腸炎のうち 116 事例を調査した。二枚貝関連 5 事例中ノロウイルス以外のウイルスは 3 事例から検出された。検出ウイルスはサポウイルス、アイチウイルス、アストロウイルスで、アストロウイルスは単独で

検出された。一方、二枚貝非関連食中毒疑い事例と中学生以上の年齢層の感染症疑い事例では、ノロウイルス事例はそれぞれ 59 事例(97%)、35 事例(92%)で大多数を占めた。その他のウイルスでは、食中毒疑い事例で A 群ロタウイルスによる単独感染が 1 事例、感染症疑い事例でサポウイルスの単独感染が 3 事例確認された。

(吉澄研究協力報告書)

##### (2) 地域における食品媒介事例等の疫学的研究

① 愛媛県で 2012 年 1 月～12 月の間に、急性胃腸炎の散発例及び集団例から検出されたノロウイルスについて解析した。散発例のうち、ノロウイルスは 52.2% (109 例)を占め、そのうち GII が 96.3% (105 例)を占めた。1 月～6 月検出の GII は 5 種類の遺伝子型であったが、10 月～12 月は 97.4%が GII.4 であった。集団では多くが GII.4 によった。食中毒 4 事例はすべて不顕性感染の調理従事者が関与し、1 月～6 月は 2006b、2008a 及び 2009a タイプ、10 月～12 月は 2012 タイプの GII.4 変異株が関与した。GII.2、GII.7、GII.13 は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 2011 年 8 月～2012 年 7 月に発生した散発性感染性胃腸炎患者の糞便および吐物計 306 検体中 206 検体(67.3%)からウイルスが検出された。内訳は、ノロウイルスが 127 検体(61.7%)、A 群ロタウイルスが 65 検体(24.9%)、サポウイルスが 9 検体(4.4%)、アストロウイルスが 5 検体(2.4%)であった。ノロウイルスの

98.4 % (125 検体)が GII で、GII.4 が主流であった。GII.4 64 株は、2006b 型 (26 株)、2004 型 (9 株)、2009a 型 (29 株)に分類された

(小林研究協力報告)

③ 広島県で検出されたノロウイルス GII.4 のカプシド領域の特定部位のアミノ酸の変異を調べたところ、2010/11 シーズンと 2011/12 シーズンでは変異のパターンが異なっていた。

(重本研究協力報告書)

#### D. 考察

##### 1. 食品からのウイルス検出法の開発・標準化

###### (1) 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

本法で得た cDNA を鋳型にした場合、 $1.0 \times 10^2$  コピー/g 以下の場合、黄色ブドウ球菌 16s リボソーム由来の非特異増幅が起こり、目的とするノロウイルスの塩基配列が得られないという課題があった。この原因として、ノロウイルスの場合、逆転写反応、1st PCR および nested PCR で同じリバースプライマーを使用するため、3つの反応で同じ非特異反応が起り、結果として鋳型量が圧倒的に多いブドウ球菌由来の配列が検出されるためと考えられた。そこで、逆転写反応専用のプライマーを用いた逆転写反応およびホットスタートやアニーリング温度を徐々に下げるタッチダウン方式による PCR を導入することによりノロウイルス GI とノロウイルス GII のいずれも食品 1g 当たり 35 コピーの量で、シーケンス解析可能な DNA

を得ることができた。また、島根県の食中毒事例に適用されたことで、実用に耐えるものであることが証明された。

###### (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患者数 200 名以上の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、原因食品からのノロウイルス遺伝子を検出することができた。さらに、新たに設計された逆転写反応専用プライマー PANR-GII で得た cDNA を用いて、増幅産物がノロウイルス由来であり、患者、調理従事者、ふき取り由来株と同一の塩基配列をもつことを確認することができた。一方、nested real-time PCR の陽性数は従来の G2SKR プライマーを使用した場合の方が多くなったことから、今後、事例数を重ねて検証していく必要があると思われた。

###### (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について多機関評価試験を実施した結果、検出率や得られた定量値は逆転写反応やリアルタイム PCR の試薬等に影響を受けることが示された。このことから、各検査機関で本法を導入するためには、検出感度や試薬の有効性の確認等を実施する必要があると思われた。また、リアルタイム PCR の定量値が各検査機関で大きくばらついたことから、その精度管理の必要性が示唆された。

###### (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

ノロウイルスのゲノム組み替えの解析に必要な、ORF1 にコードされる RdRp 領域の YGDD モチーフ上流の塩基配列のアライメントが可能となり、そこから Capsid N/S 領域全長の RT-PCR による増幅が可能となった。本研究により構築された、キメラウイルス解析に対応したプライマーセット、標準プラスミドを用いた分子疫学は、今後、新たなノロウイルスの分子疫学手法として広く普及することが期待される。

#### (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

これま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%BE 加 PBS を用いることにより、回収率は大きく (56%) と改善された。BE 加 PBS を、これまでに検討した食品にも使用したところ、野菜類で回収率が上がり、また、他の食品でも、有効性が認められたので、基本とする洗浄液を BE 加 PBS に変更することも、今後検討していく予定である。

#### (6) カキからのウイルス検出法の改良開発

細胞破碎法による中腸腺からのノロウイルスの抽出は、同一破碎条件では低い乳剤濃度が、同じ添加蒸留水量では低速の破碎が、高い抽出効果を示した。今後、破碎条件を詳細に検討することにより、酵素処理を用いた場合と同等の濃縮・抽出効果が期待される。

#### (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

ノロウイルス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、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ノロウイルスだけでなく、A 型肝炎ウイルス、サポウイルスなど様々である。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。検査したカキ 51 検体中、1 検体のみでプラークが形成された一方、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。不活化されていない MS2 フェージで、リアルタイム PCR のコピー数とプラーク数はほぼ同じであることが確認されたことから、リアルタイム PCR で陽性だがプラーク法で検出されない理由として、カキ中にプラーク形成を阻害する要因が存在し、見掛け上低く定量されている可能性や、カキ中に不活化された F-フェージが存在し、プラーク法では検出できない可能性が考えられた。感染性のある F-フェージを検出するためには、プラーク法での検出が必須であり、この乖離の原因追及とともに検査法についてさらなる検討が必要である

一方、リアルタイム PCR 法による II 群フェージとノロウイルス GII やサポウイルスの検出はよく一致し、さらに II 群フェージとノロウイルス GII のコピー数の相関係数も 0.86 と強い正の相関がみられ

た。このことは、Fファージがヒト糞便由来病原ウイルスの汚染指標になり得る可能性を示しており、さらなるデータの蓄積が必要である。

## 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

任意のアミノ酸置換に働いた自然選択圧は、その後の進化において逆向きの置換に働いた自然選択圧を検出することによって検出できると考えられた。この方法をノロウイルスに応用することにより、ノロウイルスの進化において正の自然選択が働いたアミノ酸置換を特定できると考えられる。

### (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株のサポウイルスVLPの作出に成功し、VLPsパネルの約7割をカバーすることができた。継続的に取り組むことで、実用的なサポウイルス抗原の迅速検出系、食品からのサポウイルス濃縮法の開発に寄与できると考えられる。

各遺伝子群に特異的なモノクローナル抗体およびすべての遺伝子群に反応するモノクローナル抗体を得ることができた。今後、これらの抗体を用いて、臨床検体からの検出を試み、イムノクロマト法による簡便・迅速・安価で多検体検査可能な診断法の開発について検討を進めたい。

### (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

新規法は我々がアサリ中腸腺を対象と

した場合と同様、臨床検体についても従来法より高い検出率を示し、その有用性が確認された。しかし、新規法を臨床検体に適用した場合、アストロウイルス1型にも反応する例が認められた。そのため、新規法で増幅産物が得られた場合、塩基配列を確認することが望ましい。

Genogrouping法は検出率は新規法に劣るものの、遺伝子群は系統樹解析によるタイピング結果と完全に一致し、シーケンス解析をすることなく、簡便に遺伝子群を判定する手法として有用であることが示された。

### (4) E型肝炎ウイルスに対するラットの感受性

これまで、ラットはE型肝炎ウイルスの宿主である可能性が疑われたが、確かな証拠はなかった。今回、ラットを用いた感染実験により、ヒト由来G1, G3およびG4E型肝炎ウイルスがラットに感染しないことを明らかにした。この結果はE型肝炎ウイルス感染対策上、重要な知見であると考えられる。

### (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反応系に加え、新たにA群ロタウイルス、C群ロタウイルス、アデノウイルスの3種のウイルスを加え、計10種の検出系を3本の反応系で検出する蛍光RT-マルチプレックスPCR法を開発した。本法を食中毒・感染症事例の検査に用いることで各事例におけるウイルスの感染実態を明らかにすることができた。本法では増幅遺伝子の色とサイズで検査対象ウイルスを容易に判別でき、コスト的にも通常のRT-PCRと比較して67

～84%に抑えることができる。

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の同時検出法の有用性を把握するために、過去の事例についてウイルスの検出を試み、陽性検体についてウイルスの型別検査を実施した。その結果、ノロウイルス以外の6種類の腸管系ウイルスを検出することができた。また、様々な遺伝子型のウイルスが含まれており、それらのウイルスについては、本法で検出可能と思われた。今回未検出の遺伝子型のウイルスについては、今後検討する必要がある。

#### (6) ふきとり検体からの高感度なウイルス検出法の開発

今回の市販ふきとりキットやガーゼを用いたステンレス板からのノロウイルスの回収実験では、いずれも回収率が低かった。この原因として、ステンレス板に汚染試料を塗布し、乾燥させた状態で、ウイルス粒子が壊れている可能性が考えられた。このことから、汚染ステンレス板のふきとりから BSE-PEG 水性二相分配法による回収の一連の実験で、実際の汚染量の推定は困難と思われた。今後、ステンレス板以外の汚染試料で検討が必要である。

### 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

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、アミノ酸置換が抑制されていた。この理由は不明であるが、2006/2007 シーズンに爆発的に流行したGII.4 2006bは、その時点ですでに感染・増殖能、免疫感受性、感染伝播能力等について最高レベルの生存能力を獲得しており、これを維持するために、アミノ酸置換が抑制され、変化したものは、生存能力が低下、消失して淘汰された可能性が考えられた。

#### (2) 堺市におけるキメラ型ノロウイルスの流行解析

2009/10 シーズンには GII.2 型、2010/11 シーズンには GII.3 型の大きな流行がみられたが、これらはいずれ GII.P16/GII.2 型、GII.P12/GII.3 型のキメラウイルスであった。また、2012/13 シーズンに大流行した GII.4 2012 変異株は GII.Pe/GII.4 型 (Sydney/NSW0514/2012/AU) のキメラウイルスであった。このようにキメラウイルスの出現が流行規模の拡大の要因になっている可能性が示唆された。ポリメラーゼなどのウイルス複製に関わるタンパクをコードする ORF1 とウイルス抗原性に関わる VP1 をコードする ORF2 の組み合わせによって生じたウイルス、キメラウイルスは、ウイルスの複製・増殖能および抗原性が大きく変化し、ヒト免疫圧をすり抜け、ヒト集団内の環境に一層適応したウイルスとして出現し、大きな流行の原因となった可能性が考えられる

#### (3) サポウイルスカプシド蛋白質の動的特性

昨年度の報告で、F383 近傍や I428 近

傍は 1D-3D プロファイルの共分散の絶対値が小さく、抗原部位や機能部位の候補であることが示唆されていた。今回のカプシド蛋白質の動的性質の結果も、それらが抗原部位や機能部位であることを示唆する。一方、エントロピー解析から、F383 近傍の情報エントロピーが大きいことから、F383 を含むループは抗原部位であり、I428 近傍の情報エントロピーが小さいことから、I428 を含むループは機能部位であると考えられた。

#### (4) 食品、動物、環境の汚染実態調査

大阪市の調査で 2012 年 12 月初旬に市販されていた生食用カキの約 22.2%からノロウイルスが検出されたことから、今後ともノロウイルス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。

富山県の調査で昨年度下水からの検出が減少していたノロウイルス GI.4 が、再び増加する傾向を示した。しかしながら患者からは検出されず、2010 年の調査報告と同様、不顕性感染が多い遺伝子型であると推測された。一方、前年度の調査でノロウイルスが検出された岩カキから、今回はノロウイルスやサポウイルスは検出されなかった。しかし、岩ガキによる食中毒事例がしばしば報告されていることから、引き続き岩ガキの生食には感染リスクが伴うことを留意する必要があると考えられた。

青森県で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。これは、合流水は雨水等の影響を受けるが、分流水は影響を受けないことによると考えられ、地域のノロウイルス等の汚染実

態を把握する科学的データとしては分流水が有効であると考えられる。また、感染性胃腸炎の患者報告数の増加前にもノロウイルスが検出されたことから、下水調査は散発事例の発生を推測する指標となるものと考えられた。

堺市の調査で、臨床検体からは3種類、環境検体では13種類のノロウイルスが検出され、また、サポウイルス、アストロ、アイチウイルスは臨床検体からの検出頻度は低く、環境検体からは高頻度に検出されたことから、感染症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と考えられた。

岩手県の調査で、下水処理により流入水中のウイルスはある程度除去されるが完全ではなく、放流水からもノロウイルスが検出される傾向が確認された。さらに、ノロウイルス以外の胃腸炎ウイルスも下水放流水から検出され、海水に至り、カキへ蓄積し、カキ喫食による食中毒発生の原因となる可能性が示唆された。

福岡県の調査では、汚水処理人口がほぼ同規模であるが、下水道普及率が大きく異なる2地域で下水の調査を実施したが、検出されたエンテロウイルスの種類は両地区浄化センターで類似しており、汚水処理人口の年齢構成、下水処理量及び下水道普及率等に影響されないことが示唆された。エンテロウイルスの検出は、感染症発生動向調査事業等による患者情報と比較的良く関連し、また、ノロウイルスも患者発生を反映していた。

今回、と畜検査で合格となったブタ肝

臓から E 型肝炎ウイルスの遺伝子検査を試みたところ、2.5%が陽性であった。ブタ肝臓は、カンピロバクターやサルモネラ等の食中毒菌による汚染の可能性もある。平成 24 年 7 月 1 日から生食用牛肝臓の販売が禁止されたことで、ブタ肝臓を生食用として提供している飲食店があるとの報道もあることから、ブタ肝臓の生食の危険性について、繰り返し消費者に周知徹底する必要がある。

#### (5) A型肝炎の分子疫学的研究

2010 年の全国的な diffuse outbreak の主要な原因となった IA-2 のクラスターに属する株は、2012 年には全く検出されず、ほぼ消失したものと推定される。

遺伝子型 IIIA は今年も検出されており、引き続き注意が必要と考えられる。11 月にエジプトツアー客 2 名が急性 A 型肝炎を発症し、配列が解析できた 1 名の遺伝子型は IB であった。ウイルスの分子疫学的な解析は流行状況把握の上で有用であり、今後も継続していく必要がある。

### 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ノロウイルス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。昨年に引き続き、二枚貝関連事例を中心に食中毒事例等について調査した。二枚貝事例からはノロウイルス以外にサポウイルス、アイチウイルス、アストロウイルス、エンテロウイルスが検出され、特

に、アイチウイルスの検出頻度が高かった。しかし、多くの場合ノロウイルス等との混合検出でありノロウイルス以外のウイルスの食中毒の原因との関与は不明な部分がある。一方、これらのウイルスの単独検出事例もあり、今回はアストロウイルスの単独感染事例が確認された。

一方二枚貝非感染事例や中学生以上の年齢での集団感染事例の多くはノロウイルスによる事例であった。ノロウイルス以外では、サポウイルスによる事例が多い他、A 群ロタウイルスの単独感染集団事例も確認された。これらのことから、二枚貝非関連食中毒事例や集団感染事例ではサポウイルスや A 群ロタウイルスが重要であると思われた。今後さらなる調査が必要である。

#### (2) 地域における食品媒介事例等の疫学的研究

愛媛県では 2012 年 1 月～6 月は、多種類の遺伝子型(GII. 4, GII. 2, GII. 7, GII. 13, GII. 6)が検出されたが、10 月～12 月は、GII. 13 の 1 例を除き、すべて GII. 4 で、そのすべてが 2012 変異株であった。2012 変異株は、2012 年 1 月～5 月に北海道、大阪市、沖縄県、新潟県で検出されていたことから、これらのウイルスが 2012 年 10 月以降に愛媛に持ち込まれたものと考えられた。堺市においても GII. 4 2012 変異株の検出は 10 月であり、それ以前は、他の GII. 4 変異株や他のノロウイルス遺伝子型が検出されている。これらのことから、GII. 4 2012 変異株は 10 月以降に活動を活発化したものと推定

される。不顕性感染の調理従事者が原因と考えられた食中毒が4事例見られ、そのうち2事例は、糞便中に排泄されるノロウイルス量が患者と不顕性感染者で大差はなかった。このことから、食中毒等集団発生の予防には、調理従事者への更なる衛生指導の徹底と日常の手洗いの指導が重要である。

愛知県において、2006/07シーズンの2006bの大流行以降、2009/10シーズンまでの4シーズンの間、GII.4の各変異株が流行したものの大きな流行はなかった。2010/11シーズンはGII.3が台頭し、ノロウイルスの流行遺伝子型に変動を認めたが、2011/12シーズンは再びGII.4が主流であった。2011年に検出されたロタウイルスの血清型は過去6年と概ね同様の傾向にあった。しかし、今後ロタウイルスワクチン接種の普及に伴いA群ロタウイルスの流行形態の変動が想定されるとともに、食品媒介事例への関与の変化も否定できないことから、感染性胃腸炎の病原体ウイルスサーベイランスの意義が益々重要となると考えられた。

## E. 結論

### 1. 食品からのウイルス検出法の開発・標準化

- パンソルビン・トラップ法においてPCRで用いるものとは異なる専用プライマーを用いて逆転写反応を行うことで、検出された遺伝子のシーケンスを確認することが可能となった。この方法は島根県浜田市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の用いて、実際の食中毒事例の食品からノロウイルスを検出し、増幅産物の塩基配列を決定することができた。
- パンソルビントラップ法による検出率や得られる定量値は、逆転写反応およびリアルタイムPCRの試薬等に影響を受ける。また、リアルタイムPCRの定量値が各検査機関で大きくばらついたことから、その精度管理が必要である。
- 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。
- ACP微粒子濃縮法でこれま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%BE加PBSを用いることにより、回収率は平均で56%と大きく改善された。
- 細胞破砕法によるカキ中腸腺からのノロウイルスの抽出は、同一破砕条件では乳剤濃度の低い方が、同じ添加蒸留水量では低速で破砕した方が、高い抽出効果を示した。
- ヒト糞便由来ウイルス汚染指標のためのカキ中のFファージ検出法を検討した結果、カキ中のF-ファージプラーク数は、リアルタイムPCR法から推定される量より低かった。リアルタイムPCR法によるII群ファージとノロウイルスGIIあるいはサボウウイルスの検出とよく一致した。II群ファージとノロウイルスGIIのコピー数の相関係数は0.86と強い正の相関がみられた。



2. ウイルス性食中毒の検査体制の強化
  - ノロウイルスのゲノムがコードする構造蛋白質，非構造蛋白質の進化において起こっ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。
  - 新たにサポウイルス 2 株の VLP の作成に成功した。
  - 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。
  - 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。
  - 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検出する蛍光 RT-マルチプレックス PCR 法を新たに開発した。
  - 2 種類のマルチプレックスリアルタイム PCR 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系で陽性となった検体の遺伝子型別を行い，その有用性を検証した。
3. 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において，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。
3. 食品，動物，環境の汚染実態調査と分子疫学的研究
  - 2012 年 12 月採取の市販生食用カキの 22.2% からノロウイルスが検出された(大阪市)。
  - イノシン及びシカから E 型肝炎ウイルス遺伝子を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。
  - GI.4 は下水から高頻度に検出されたが，患者からは検出されなかった。
  - 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
  - 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。
  - 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の地域における浸淫状況を把握する有効な手段である。
  - 下水放流水から各種の下痢症ウイルスが検出された。
  - 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，GII.4 2006b 変異集団ではよく保存されていた。
  - サポウイルスカプシド単量体の分子動力学計算を生理的条件下で行い，RMSF および DCCM (Dynamics Cross Correlated Motion: 動的相互相関運動) を調べ，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。
  - 2010/11~20011/12 シーズンに検出された GII.2, GII.7 および GII.13 はキメラウイルスであった(愛媛と新潟?)。

- 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。
4. 食品媒介性ウイルスの疫学的, 基礎的研究
- 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。
  - 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。GenogroupingPCR法による群別はシークエンスに基づく群別と完全に一致した。
  - 二枚貝食中毒事例等について検査した結果, ノロウイルス以外にサポウイルス, アストロウイルス, アイチウイルス, A群ロタウイルス,

エンテロウイルスが検出された。

- 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。
- 2012/13シーズンはGII.4 2012変異株が大流行を起こした。

#### F. 健康危害情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

「研究成果の刊行に関する一覧」に記載

##### 2. 学会発表

「研究成果の刊行に関する一覧」に記載

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 研究分担報告書

田中 智之  
斎藤 博之  
鈴木 善幸  
佐藤 裕徳  
横山 勝  
片山 和彦  
村上 耕介  
石井 孝司  
李 天成  
野田 衛

平成 25 (2013) 年 3 月

## 堺市におけるキメラ型ノロウイルスの流行解析

研究分担者	田中 智之	堺市衛生研究所
研究協力者	三好 龍也	堺市衛生研究所
研究協力者	内野 清子	堺市衛生研究所
研究協力者	芝田 有理	堺市衛生研究所
研究協力者	吉田 永祥	堺市衛生研究所

### 研究要旨

2004/05 シーズンから 2012/13 シーズンまで、当研究所で検出されたノロウイルス 197 株を対象とし、Polymerase 領域と N/S domain 領域の遺伝子解析を行った。その結果、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 NoV の流行に関連性が認められた。2004/05 には GII. P12/GII. 4, 2009/10 には GII. 2 の GII. P16/GII. 2, 2010/11 には GII. 3 の GII. P12/GII. 3、そして 2012/13 には GII. Pe/GII. 4 のキメラウイルスが認められた。この GII. 4 キメラウイルス; Sydney/NSW0514/2012/AU が流行の大きな要因であった可能性は世界的にも共通していると思われる。このような変異型 NoV の遺伝子型別検索は、VP1 領域 (N/S domain) のみならず Polymerase 領域の解析を加えることにより、さらに変異株の出現が予測でき、NoV 感染予防対策に寄与できる。

### A. 研究目的

ノロウイルス (NoV) は、小児を中心に流行する感染性胃腸炎の主な原因ウイルスである。毎年、冬季を中心に流行し、食中毒の原因や保育・学校から成人・高齢者の社会福祉施設など施設内での胃腸炎の集団感染へと拡大し、公衆衛生上の対策が必要とされる重要なウイルスである。

NoV は、約 7kb のプラス 1 本鎖 RNA をもつ RNA ウイルスであり、そのウイルスゲノム上には、3 つの Open Reading Frame (ORF) が存在する。ORF1 には非構造タンパク質が、ORF2、ORF3 に

は、構造タンパク質 VP1、VP2 がそれぞれコードされている。この ORF1 と ORF2 の境界領域には、各遺伝子型間で高度の保存領域があるが、この領域での異なる遺伝子型ウイルスの遺伝子組み換えが頻繁に生じ、キメラウイルスの出現が報告されている。

これまでの NoV 流行株について、ORF1、ORF2 領域の遺伝子解析を行い、キメラウイルスの流行頻度について考察する。

### B. 研究方法

#### 1. 材料

2004/05 から 2012/13 の 8 シーズン中に、当研究所で検出された NoV 散発事例由来 135 株、NoV 集団事例由来 62 株を解析対象とした。

## 2. 方法

Polymerase 領域 (ORF1) 検出用 Primer (Yuri22F/R : 373bp、NV82 SM82 /NV81 : 330bp) および VP1 (N/S domain) 領域 (ORF2) 検出 Primer (G1 : 329 bp、G2 : 336bp) を用いて RT-PCR による遺伝子増幅を行い、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定した。

また、2012/13 シーズンについては、ORF1 と ORF2 の境界領域を含む領域の約 1100bp (Yuri22F/G2R) の遺伝子を解析した。遺伝子型別は、Norovirus Genotyping Tool Version 1.0

([http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typing\\_tool](http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typing_tool)) を用いて行った。詳細な NoV 遺伝子検出法は、「ウイルス性下痢症診断マニュアル (第 3 版)」に準じて行った。

### (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

Polymerase 領域が GII.12 Saitama U1 (AB039775) 型、VP1 領域が GII.4 Sakai (AB220922) 型 (GII.P12/GII.4) は、2004 年に検出され、2006/07 シーズンまでは検出されていたが、2007 年以降検出されなくなった。GII.P4/GII.4 型は調査期間をとおして検出された (図 1、2)。GII.P12/GII.3 型は、2005/06 シーズンにから検出された後、2010/11 シーズンには大きな流行がみられた (図 3)。また、2005/06 シーズンには 1 例だけであるが、GII.Pb/GII.3 型が検出された (図 3)。2009/10 シーズン以降 GII.P16/GII.2 型が検出され、2010/11 シーズンには GII.Pg/GII.12 型が検出された (図 4)。2012 年 10 月以降 GII.Pe/GII.4 型が検出されている (図 5)。

GII.4 型系統の NoV は、GII.P4/GII.4 型は 103 株、GII.P12/GII.4 型は 17 株、

GII.Pe/GII.4 型 43 株検出された。GII.3 型系統の NoV は、GII.P3/GII.3 型は 1 株、GII.P12/GII.3 型は 22 株、GII.Pb/GII.3 型 1 株検出された。GII.2 型系統の NoV は、GII.P2/GII.2 型は 4 株、GII.P16/GII.2 型は 4 株検出された。GII.Pg/GII.12 型は 2 株検出された。

## D. 考察

2004/05 シーズンは、NoV GII.4 型の全国的な大流行があり、キメラ型の GII.P12/GII.4 によるものと考えられた。近年、GII.4 型の亜株が主流株であったが、感染症発生動向調査事業による全国的な流行状況では、2009/10 シーズンには GII.2 型、2010/11 シーズンには GII.3 型の大きな流行がみられた。これらの流行は、キメラ型の GII.P16/GII.2 型、GII.P12/GII.3 型によるものと考えられた。GII.Pg/GII.12 型は、現在のところ大きな流行には関与していないが、海外では流行が報告されている。GII.Pe/GII.4 型 (Sydney/NSW0514/2012/AU) は、今シーズン全国的な流行として見られている。

NoV の遺伝子型別では、VP1 領域 (N/S domain) を用いる場合が多い。今回解析した NoV は、N/S domain 領域では GII.2、GII.3、GII.4 および GII.12、GII.16 の 5 種類に分類されたが、Polymerase 領域の解析を加えることにより GII.2 は 2 種類、GII.3 は 3 種類、GII.4 は 3 種類、GII.12 は 2 種類、計 10 種類に分類することができ、NoV 流行株の変化をより詳細に捉えることができた。

その結果、検出された多数のキメラウイルスと NoV 流行の変化に関連性が認められた。

以上のことから、Polymerase などのウイルス複製に関わるタンパクをコードする ORF1 とウイルス抗原性に関わる VP1 をコードする ORF2 の組み合わせによって生じたウイルス、キメラウイルスは、ウイルスの複製・増殖能および抗原性が大きく変化し、ヒト免疫圧をすり抜け、ヒト集団内の環境に一層適応したウイルスとして出現し、大きな流行の原因となった可能性が考えられる。世界的にもキメラウイルス；

GII. 4/Sydney/NSW0514/2012/AUによる大流行と理解されている。

## E. 結論

2004/05 シーズンから 2012/13 シーズンまで検出された NoV 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 NoV の流行に関連性が認められた。NoV の遺伝子型別では、VP1 領域 (N/S domain) を用いる場合が多いが、Polymerase 領域の解析を加えることにより流行株の遺伝子の変化をより詳細に捉えることができた。

## F. 研究発表

### 論文発表

- 1). Noritoshi Kitamoto, Tomoichiro Oka, Kazuhiko Katayama, Tian-Cheng Li, Naokazu Takeda, Yoji Kato, Tatsuya Miyoshi and Tomoyuki Tanaka: Novel monoclonal antibodies broadly reactive to human recombinant sapovirus-like particles. *Microbiol. Immunol.* 56; 760-770, 2012
- 2). 田中智之、三好龍也、内野清子、吉田永祥. 感染症迅速診断キットの有用性と限界-ノロウイルス- *小児科* 53(4), 437-442, 2012
- 3). 田中智之、小林尚明、豊田 茂、佐藤雅久、佐野康子、竹田弘、柏井健作、

家永信彦、中田修二、宇加江進、佐藤勇、原錬太郎、中野 徳、田中敏博、五十嵐隆夫、水澤一郎、田尻 仁. ノロウイルス抗原迅速診断試薬クイックナビ™ -ノロ2の評価. *医学と新薬* 68(6), 1033-1039, 2012

- 4). 本村和嗣, 横山勝, 岡智一郎, 片山和彦, 野田衛, 田中智之, 佐藤裕徳, Norovirus Surveillance Group of Japan ノロウイルスのゲノム解析と流行発生のしくみ. *感染症学雑誌*: 86: 563-568, 2012

- 5). 田中 智之.

新規に保険収載された検査法  
ノロウイルス抗原迅速定性検査  
*モダンメディア*: 58(11); 337-341, 2012

### 3. 学会発表

- 1) 三好龍也 内野清子 本村和嗣 佐藤裕徳 田中智之: 堺市におけるキメラ型ノロウイルスの検出状況. 第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012

## 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

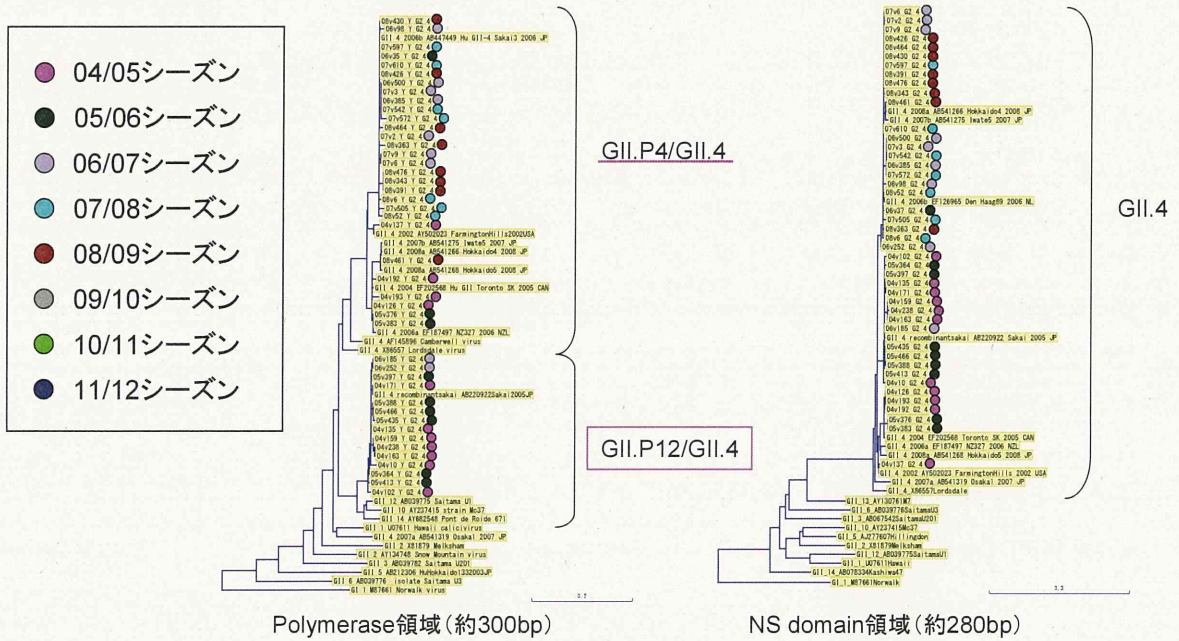


図1 NoV遺伝子系統樹解析結果 (GII.4型:2004/05~2007/08シーズン)

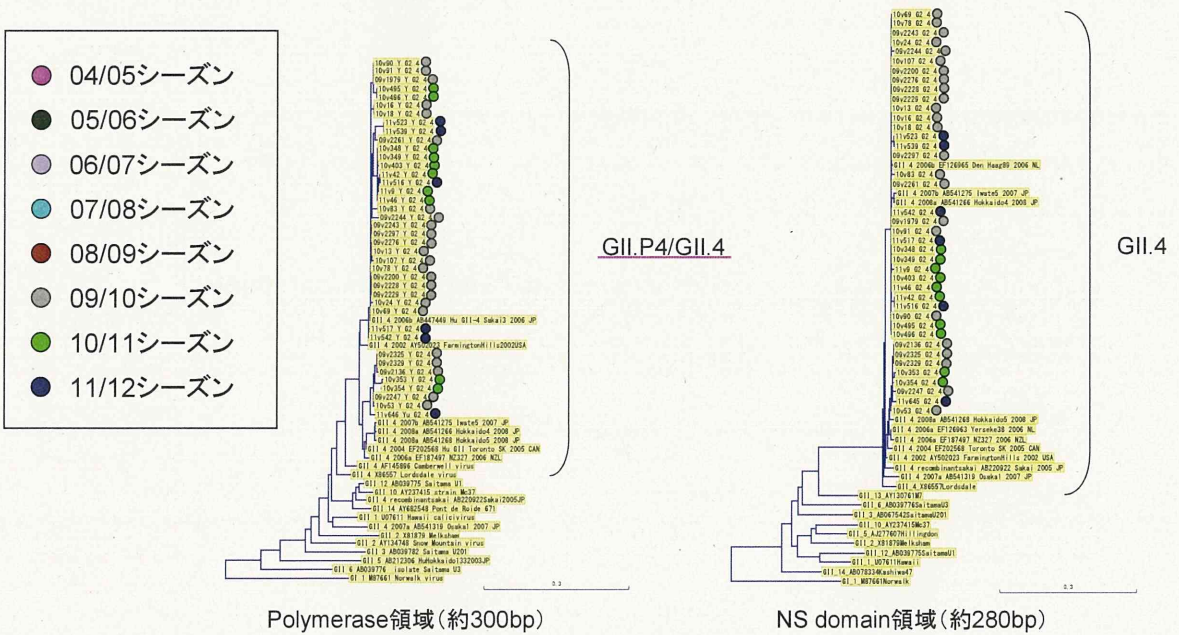


図2 NoV遺伝子系統樹解析結果 (GII.4型:2009/10~2011/12シーズン)

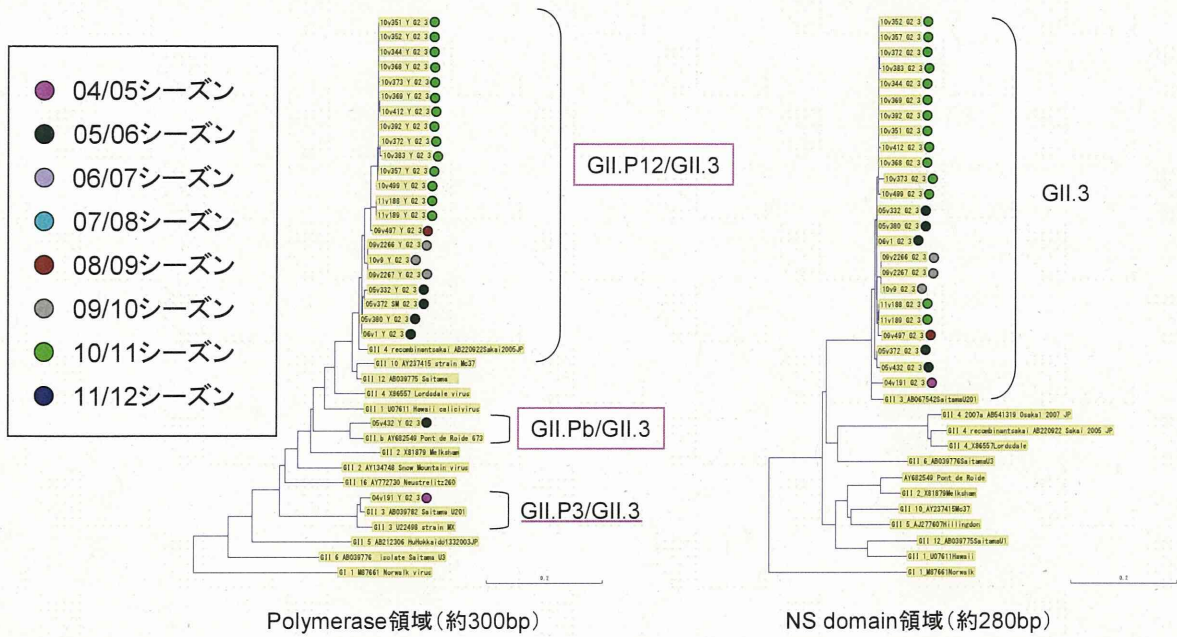


図3 NoV遺伝子系統樹解析結果(GII.3型)

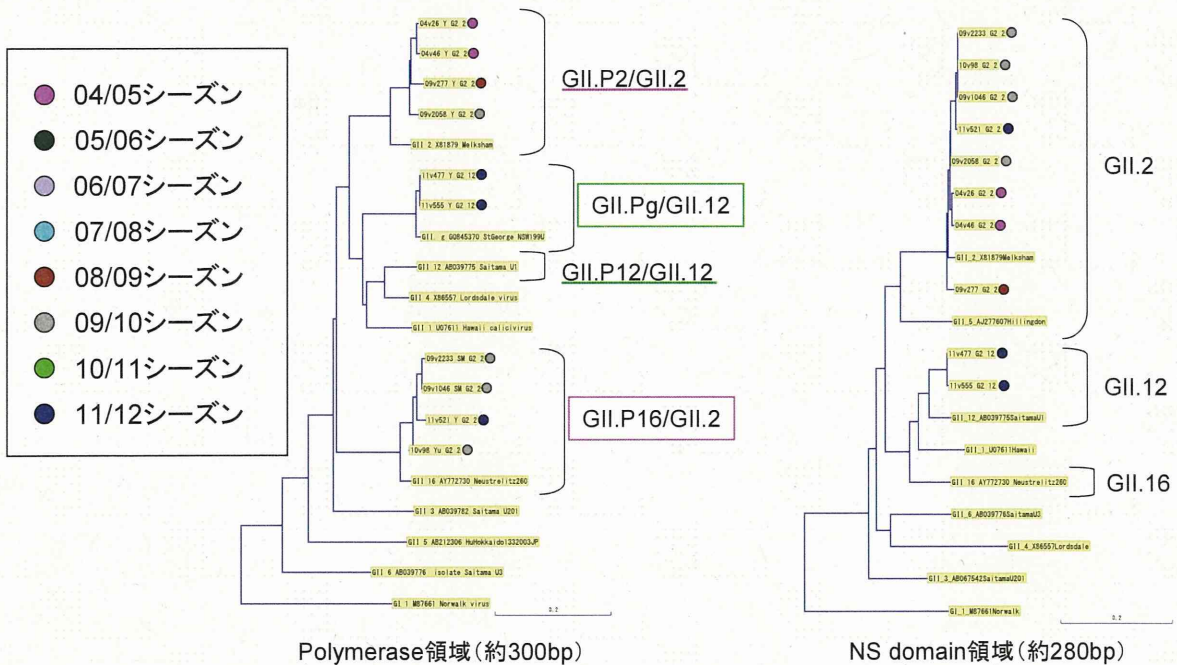


図4 NoV遺伝子系統樹解析結果(GII.2, 12型)



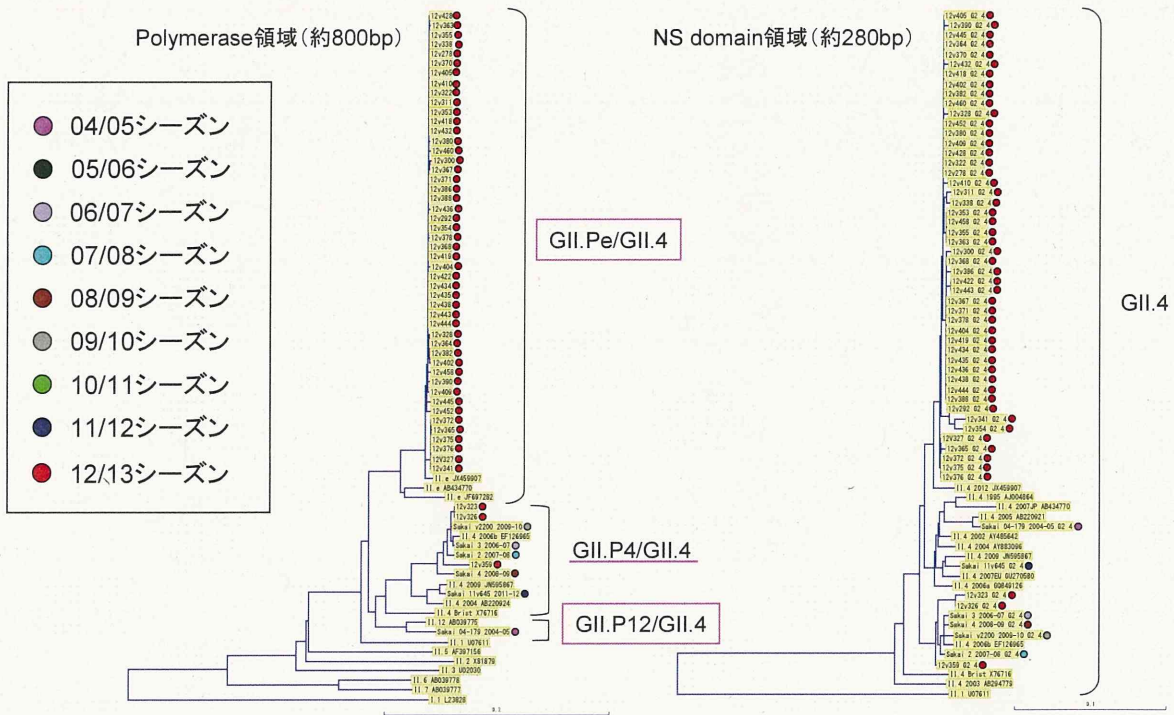


図5 GII.4型 2012/13シーズンNoV遺伝子系統樹解析結果(ORF1/2:1100bp)

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」  
研究分担報告書

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

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

パンソルビン・トラップ法は、食品検体に含まれるウイルス粒子を黄色ブドウ球菌の表面に吸着させて回収することを基本原理としている。その性質上、抽出された RNA には大量の黄色ブドウ球菌由来の遺伝子が混入し、遺伝子解析の障害となることが前年度の研究で明らかとなった。黄色ブドウ球菌の遺伝子そのものは、極微量のウイルス RNA を安定的に保持するキャリアーとして働くため、検出感度に対してはプラスの効果が見込める。従って、それを排除するのではなく、遺伝子解析に影響が及ばないようにする解決策が求められた。本研究では、逆転写反応時に PCR で用いるものとは異なる専用プライマーを使うことで、遺伝子解析可能な PCR 増幅産物を得ることに成功した。さらに、増幅プロセスにホットスタート&タッチダウン PCR を用いることで一層の改善が認められた。また、ノロウイルス GI/4、及びノロウイルス GII/4 で汚染させたポテトサラダにおける本法の検出限界は、両者とも食品 1g 当たり 35 コピーであった。以上のことにより、黄色ブドウ球菌のキャリアーとしての長所を活かし、遺伝子解析の障害という短所を顕現させないようにするという目的は達成された。

### 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 of 解明に決め手を欠いていた。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(AdV41)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、平成 22 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が急務となっている。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。その際に各種ウイルスに対する抗体の安定供給が課題となっていたが、平成 22 年度の本研究事業において、市販のガンマグロブリン製剤を利用することで汎用化に成功した。これまで NoV では 13 遺伝子型 (GI/3、GI/4、GI/8、GI/9、GI/14、GII/2、GII/3、GII/4、GII/5、GII/6、GII/12、GII/13、GII/18)、SaV ではヒトに感染する 4 種類全ての型、さらには HAV と AdV41 について、ガンマグロブリン製剤を用いたパントラ法が有効であることが確認され、実事例への適用も可能となった。普及にあたって、本法の根幹をなすパンソルビンを製造・販売しているメーカーが 1 社しかないことから、在庫切れや製造中止などのリスクが問題となったが、平成 23 年度に自家調製プロトコルが完成したことで払拭された。今年度は、実用に供した段階で新たに見つかった、非特異反応が多すぎて遺伝子解析が困難であるという問題を解決するための検討を行った。

## B. 研究方法

### 1. 研究材料

実験に用いる食品として、市販されている焼きそばとポテトサラダを用いた。また、検出対象となるウイルスとして、NoV-GII/4 (AB293424)、及び NoV-GI/4 (AB685383) を含む糞便を用いた。

### 2. 試薬類

#### 1) 食品洗滌液

Tris-HCl (pH8.4) – 0.5M NaCl – 0.1% Tween20 を調製して使用した。

#### 2) 5%ガンマグロブリン製剤

米国 Baxter 社の 5% 静注用ガンマグロブ

リン製剤「Gammagard」を用いた。Alfresa Pharma 社から購入した。

#### 3) 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。

#### 4) フェノール系 RNA 抽出キット

TRIzol-LS (invitrogen) を使用した。

#### 5) カラム方式の RNA 抽出キット

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

#### 6) 再懸濁液

5) の抽出キット添付の AVL 液を用いた。

#### 7) 逆転写反応エンハンサー

RTmate (ニッポンジーン) を使用した。

#### 8) DNase I (RT Grade) 及び RNase inhibitor

ニッポンジーンの製品を使用した。

#### 9) アミラーゼ

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

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

#### 10) 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。

#### 11) 逆転写酵素

ReverTra Ace (東洋紡) を使用した。

#### 12) ノーマル PCR 用酵素

Taq DNA Polymerase High Yield (グライナー) を用いた。

#### 13) ホットスタート&タッチダウン PCR 用酵素

KOD FX Neo (東洋紡) を用いた。

#### 14) 逆転写反応に用いたプライマー

ランダムプライマー (9mer, タカラバイオ)、

G1SKR と G2SKR (Kojima S., et. al., J. Virol. Method, 100, 107-114, 2002)、及び新規開発の逆転写反応専用プライマー PANR-G1 と PANR-G2 を用いた。PANR-G1 は表 1 に示した PANR-G1a と PANR-G1b を 1:1 で混合したものである。PANR-G2 は表 1 に示した PANR-G2a、PANR-G2b、及び PANR-G2c を 2:1:1 で混合したものである。

### 3. パントラ法の手順

平成 22 年度に完成した汎用プロトコル (図 1) に従った。

### 4. ウイルスの検出

図 1 で得られた抽出液 (60 $\mu$ L) から 8.5 $\mu$ L を取り、DNase I 及び  $\alpha$ -Amylase Ultrapure を各 1 $\mu$ L、RNase inhibitor を 0.25 $\mu$ L、5 $\times$ 逆転写 buffer (添付) を 4 $\mu$ L 加えた後、蒸留水で反応量を 15.5 $\mu$ 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、プライマー (前述のもの)、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 $\mu$ L)。合成した cDNA 溶液を 5 $\mu$ L 取り、COG1F (Kageyama T., et. al., J. Clin. Microbiol., 41, 1548-1557, 2003) / G1SKR、または COG2F (COG1F と同一文献) / G2SKR による 1st. PCR と、G1SKF/G1SKR または G2SKF/G2SKR による semi-nested RT-PCR を行った。この増幅反応において、通常用いられるノーマル PCR と、より特異性の高いホットスタート&タッチダウン PCR の比較を行った。反応温度条件は、次のとおりである。

#### 【ノーマル PCR】

94 $^{\circ}$ C 4 分 1 サイクル

94 $^{\circ}$ C 30 秒 - 50 $^{\circ}$ C 30 秒 - 72 $^{\circ}$ C 30 秒 40 サイクル

72 $^{\circ}$ C 7 分 1 サイクル

#### 【ホットスタート&タッチダウン PCR】

94 $^{\circ}$ C 4 分 1 サイクル

94 $^{\circ}$ C 30 秒 - (55 $\rightarrow$ 50 $^{\circ}$ C) 30 秒 - 72 $^{\circ}$ C 30 秒  
5 サイクル: 下線部がタッチダウン設定

94 $^{\circ}$ C 30 秒 - 50 $^{\circ}$ C 30 秒 - 72 $^{\circ}$ C 30 秒 40 サイクル

72 $^{\circ}$ C 7 分 1 サイクル

PCR 産物のゲル電気泳動で予想位置にバンドが認められた場合は切り出してシークエンスを試みた。また、1st. PCR 産物に対して real-time PCR (Kageyama T., et. al., J. Clin. Microbiol., 41, 1548-1557, 2003) を行い、NoV 特異的な増幅の有無を検討した。使用した real-time PCR 装置はロシユ製「LightCycler 350S」で、反応容量は 20 $\mu$ L である。

## C. 研究結果

### 1. 前年度における問題点

さまざまなレベルで汚染させた焼きそばから、Gammagard を用いて NoV 回収を行った際の増幅曲線を図 2 に示した。これによると、汚染度 35 コピー/g と 10 コピー/g で明確に陽性と陰性が分かれていることがわかる。一方、上記の 1st. PCR 産物をプライマー G2SKF / G2SKR による semi-nested RT-PCR で再増幅し、アガロースゲル電気泳動で確認したところ、汚染度 3.5 $\times$ 10<sup>2</sup> コピー/g までは 344bps の増幅バンドが認められ