

201234010B

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22年度～24年度 総合研究報告書

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 22 年度～24 年度 総合研究報告書

研究代表者 野田 衛

平成 25 (2013) 年 3 月

## 目 次

### I. 総合研究報告

食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究

野田 衛 ----- 3

#### (総合分担研究、研究協力報告)

1. 食中毒事例におけるノロウイルス関与

田中 智之 他 ----- 33

2. パンソルビン・トラップ法による食品中の病原ウイルス検査の実用化

斎藤 博之 ----- 41

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の全ゲノム解析

佐藤 裕徳 他 ----- 65

5. カリシウイルス capsid 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

横山 勝 ----- 73

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 ----- 79

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 ----- 91

8. 日本における 2010～2012 年の A 型肝炎の分子疫学的解析

石井 孝司 他 ----- 97

9. HEV の安定性、抗原性および感受性の研究

李 天成 他 ----- 105

10. 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

篠原 美千代 他 ----- 113

11. カキ中腸腺からのノロウイルス (NoV) 濃縮・抽出法の検討

植木 洋 他 ----- 129

12. ノロウイルスによる環境の表面汚染検出法の検討

田村 務 他 ----- 135

13. 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 ----- 141

14. 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 ----- 155

15. カキ関連食中毒疑事例からの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 ----- 161

16.	愛知県における感染性胃腸炎患者からのノロウイルス検出状況	小林 慎一 他	-----	173
17.	愛媛県で検出されたノロウイルスの分子疫学的解析	山下 育孝 他	-----	177
18.	新たに報告されたプライマーによる食品・患者からのサポウイルスの検出	飯塚 節子 他	-----	187
19.	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	-----	195
20.	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	-----	207
21.	終末処理場の処理前の下水及び生カキにおけるノロウイルス等汚染実態調査	三上 稔之 他	-----	215
22.	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	-----	223
23.	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	-----	233
24.	下水処理施設、垂下カキおよびカキ喫食中毒事例患者からの下痢症ウイルスの検出	森田 晴美 他	-----	239
25.	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	-----	249
26.	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	原田 誠也 他	-----	255
27.	サポウイルス VLPs に対する新規単クローン抗体の樹立とその解析	北元 憲利 他	-----	263

## II. 検査法マニュアル

1.	一般的な食品検体からのウイルスの回収・濃縮法	-----	273
2.	食品検体からのウイルス回収・濃縮に使用する 黄色ブドウ球菌加工試薬の自家調製法	-----	281
3.	一般的な食品検体および水検体からのウイルス回収・ 濃縮法	-----	287
4.	カキ中腸腺からのウイルス抽出方法	-----	293
5.	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	-----	297
6.	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	-----	301

7.	Multiplex real-time PCRによる腸管系ウイルスの一斉検索法	-----	309
III.	研究成果の刊行に関する一覧	-----	317
IV.	研究成果の刊行物・別刷	-----	343



## I 総合研究報告

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」  
総合研究報告(平成 22~24 年度)

## 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であるパンソルビン・トラップ法において、ガンマグロブリン製剤や逆転写反応専用プライマーの導入により各種のノロウイルス遺伝子型や他の食品媒介ウイルスの検出および食品中の微量な汚染ウイルスのシークエンス解析が可能となった。本法を用いて実際の食中毒事件の関連食品からノロウイルスが検出され、シークエンス解析で遺伝子型が決定された。本法について多機関評価試験を実施したところ、検出率や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たため、検査法の改良に繋がった。別の食品検査法である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検出法を開発した。回収率の向上を図るために検査対象食品ごとに改良を加え、多くの食品で改善が図れた。高感度なノロウイルス検出系の開発を目的として、新たに 18 株のノロウイルスの全塩基配列を決定するとともに、キメラ型ノロウイルス検出に対応したプライマーセットおよび標準プラスミドを構築した。カキ中腸腺からのノロウイルス検出において、アミラーゼやリパーゼなどの酵素処理が有効であることが確認されるとともに、細胞破砕法を改良し、高感度化が図れた。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討した結果、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かった。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 あるいはサポウイルスの検出はよく一致し、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 0.76 と正の相関がみられたことから、F フェージはヒト糞便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を目的に、インフルエンザウイルスをモデルとして、遺伝子組み換え上の位置の特定、自然選択圧を検出する方法等を開

発した。サポウイルスの迅速検査法開発に向けて、サポウイルス 10 株の VLP の作製に成功し、また、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遺伝子群特異的あるいは遺伝子型特異的な抗体を得た。A 型肝炎ウイルス検出 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 RT-マルチプレックス 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を確立した。水性二相分配法によるふきとり等清浄な液体からのノロウイルス濃縮法を開発した。環境水のサポウイルス検出に有用な新規法を食用貝や胃腸炎患者検体で評価したところ、従来法と比較して高い検出率を示した。しかし、臨床検体の場合、アストロウイルス 1 型が検出されることがあり、新規法で増幅産物が得られた場合、塩基配列の確認が望まれる。

### (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実施した。2010 年 1 月～2012 年 3 月に採取(買取)された国産食用カキ 26 ロット中 12 ロット(46.2%)から、2011 年と 2012 年の 4 月～7 月に採取された岩ガキ 39 検体中 2 検体(5%)からノロウイルスが検出された。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。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。河口部での垂下カキによるウイルスのモニタリングは、下水中のウイルスの動向把握に有用であった。イノシシ 173 頭中 13 頭(7.5%)、ブタ 1,634 頭中 15 頭(0.9%)から E 型肝炎ウイルス遺伝子が検出されたが、シカ 63 頭からは検出されなかった。検出遺伝子型はイノシシでは地域特異的、豚では養豚場特異的であった。と畜検査で合格となったブタ肝臓 80 検体中 2 検体(2.5%)から E 型肝炎ウイルス遺伝子が検出され、豚肝臓の E 型肝炎ウイルス汚染リスクが示された。ブタ血清中の抗 E 型肝炎ウイルス-IgG 抗体を調査したところ、966 頭中 695 頭(71.9%)が陽性であった。

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ノロウイルス 395 株の全ゲノムの塩基配列を決定した。GII.4 は 8 種類の亜型に分類され、その多くはキメラウイルスであった。GII.4 2006b は 5 年間主要株であり続け、ゲノムの多様性を蓄積したが、アミノ酸置換はカプシド領域においても抑制されていた。2012/13 シーズンに検出されたノロウイルスの多くは GII.4 の新しい変異株(2012 変異株、仮称)であった。過去数年間に検出された各種のノロウイルス遺伝子型の多くは、異なる遺伝子型間で



組み換えを起こしたキメラウイルスであった。サポウイルスカプシド蛋白質について、1D-3D プロファイル法，エントロピー解析，および分子動力学計算を行い，サポウイルスカプシド蛋白質の抗原部位や機能部位と推定される部位を明らかにした。2010年から2012年のA型肝炎事例を分子疫学的に解析し，2010年の多発の原因，遺伝子型IIIAの日本への定着の可能性等を明らかにした。

#### (4) 食品媒介性ウイルスの疫学的，基礎的研究

疫学的調査でカキ非関連集団ノロウイルス感染事例からGI.4とGII.3の遺伝子が検出された。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。特にGII.3のキメラウイルスが出現した2010年度は感染性胃腸炎の流行規模の大きいシーズンであった。2010年1月にサポウイルスによる患者数655名の大規模食中毒が発生した。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，二枚貝関連事例で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，A群ロタウイルス，アデノウイルスが検出されたことから，ノロウイルス以外のウイルスについても検査の実施が望まれた。調理従事者からの食品の二次汚染の場合は，ノロウイルスによる事例が大多数を占めたことから，ノロウイルスが検出されない，またはノロウイルスの検出率が低い場合には，他のウイルスの検査の実施が望まれる。特に，サポウイルスとA群ロタウイルスが重要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で大差はなかった。G1 E型肝炎ウイルスは他の遺伝子型E型肝炎ウイルスと同様の条件で加熱や紫外線照射によって不活化された。G5 E型肝炎ウイルスの抗原性は従来のヒト由来E型肝炎ウイルスと類似した。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かった。

本研究班で改良，開発した各種の検査法をマニュアルとして取りまとめた。

<b>研究分担者</b>		岡 智一郎	同上
田中 智之	堺市衛生研究所	村上 耕介	同上
斎藤 博之	秋田県健康環境センタ	石井 孝司	同上
	—	李 天成	同上
鈴木 善幸	名古屋市立大学		
佐藤 裕徳	国立感染症研究所	<b>研究協力者</b>	
本村 和嗣	同上	内野 清子	堺市衛生研究所
横山 勝	同上	三好 龍也	同上
片山 和彦	同上	岡山 文香	同上

久保 裕季子	同上	研究所
吉田 永祥	同上	阿部 勝彦 広島市衛生研究所
芝田 有理	同上	山本 美和子 同上
松尾 光子	同上	田中 寛子 同上
西口 智子	同上	井澤 麻由 同上
小林 由紀	名古屋市立大学	藤井 慶樹 同上
吉澄 志磨	北海道立衛生研究所	京塚 明美 同上
後藤 明子	同上	石村 勝之 同上
石田 勢津子	同上	植木 洋 宮城県保健環境センタ
森 功次	東京都健康安全研究セ	一
	ンター	川端 淑子 同上
永野 美由紀	同上	高橋 由理 同上
秋場 哲哉	同上	篠原 美千代 埼玉県衛生研究所
林 志直	同上	島田 伸一 同上
入谷 展弘	大阪市立環境科学研究	内田 和江 同上
	所	富岡 恭子 同上
改田 厚	同上	鈴木 典子 同上
阿部 仁一郎	同上	貫洞 里美 同上
関口 純一朗	同上	小川 泰卓 同上
山元 誠司	同上	岸本 剛 同上
久保 英幸	同上	峯岸 俊貴 同上
小和田 和誠	福井県衛生環境研究セ	河橋 幸恵 同上
	ンター	重本 直樹 広島県立総合技術研究
山本 希	同上	東久保 靖 同上
平野 映子	同上	久常 有里 同上
中村 雅子	同上	飯塚 節子 島根県保健環境科学研
大村 勝彦	同上	研究所
吉田 徹也	長野県環境保全研究所	木内 郁代 同上
宮坂 たつ子	同上	北元 憲利 兵庫県立大学
畔上 由佳	同上	山下 育孝 愛媛県立衛生環境研究
内山 友里恵	同上	所
笠原 ひとみ	同上	青木 里美 同上
上田 ひろみ	同上	立花 早苗 同上
長瀬 博	同上	青木 紀子 同上
藤田 暁	同上	四宮 博人 同上
田村 務	新潟県保健環境科学研	

三上 稔之	青森県環境保健センタ ー
筒井 理華	同上
東海林 彰	同上
古川 紗耶香	同上
吉田 綾子	同上
井上 治	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
小淵 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 知子	同上
高橋 雅輝	同上
齋藤 幸一	同上
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
古川 義朗	同上
靄田 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
大迫 英夫	同上
吉岡 健太	同上
岩切 章	宮崎県衛生環境研究所
横井 一	千葉県環境保健研究所

田中 俊光	同上
小林 圭子	同上
斎藤 哲也	新潟市衛生環境研究所
吉田 徹也	長野県環境保全研究所
柴田 伸一郎	名古屋市衛生研究所
飯島 義雄	神戸市環境保健研究所
戸高 玲子	国立感染症研究所
ハンスマン・グ ラント	同上
劉 蘭軍	同上
片岡 紀代	同上
吉崎 佐矢香	同上
脇田 隆宇	同上
網 康至	同上
片岡 紀代	同上
高橋 和明	東芝病院
三代 俊治	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・トラップ法による食

#### 品中の病原ウイルス検査の実用化

平成 21 年度までの前研究班で開発したパンソルビン・トラップ法を実際の食中毒事例への適応を想定し、①食品中のウイルスを捕捉するための抗体としてのガンマグロブリン製剤の有用性の検討、②パンソルビン相当品の自家調製法の検討、③本法で得た DNA のシーケンス解析への対応を検討した。

#### (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ノロウイルス食中毒事例および 2012 年 3 月島根県で発生した食中毒事例の原因食品の特定のための検査に適応した。

#### (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、ノロウイルス GII/4 を汚染させたきな粉を汚染食品として 11 機関による多機関評価試験を実施した。

#### (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

ノロウイルスの遺伝的多様性を解析し、新たに作出すべき抗体、VLP を選択した。標準物質としてプラスミド DNA、試験管内合成 RNA を作製し評価した。次世代の世界標準となるノロウイルスの遺伝子型別システムが提唱されたため、それに対応しかつキメラウイルス解析に対応した標準プラスミド DNA およびポリメラーゼ領域から VP1 領域の一部を増幅するプライマーセット並びに同領域の全長を増幅するプライマーセットの構築および改良を行った。

(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、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、野菜・果実類、穀物類、食肉・魚肉類等の対象にネコカリシウイルスを用いた添加回収実験を実施した。また、ウイルス回収率の低い食品について濃縮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

回収率の高いカキからのノロウイルス濃縮・抽出法を確立するためにカキ中腸腺を細胞破碎後にアミラーゼとリパーゼで処理した方法(以下それぞれアミラーゼ直接法、リパーゼ直接法)、中腸腺に所定濃度のアミラーゼおよびリパーゼを添加し(以下それぞれアミラーゼ処理、リパーゼ処理)消化後、ストマッカーで粉碎し遠心上清にポリエチレングリコール(PEG)処理を加えた方法、さらには酵素を用いない細胞破碎法を改良した方法(改良細胞破碎法)で中腸腺からノロウイルス濃縮・抽出後に、定量PCR法で遺伝子の検出を行いノロウイルスの濃縮・抽出効果を評価した。

(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、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、サポウイルスの検出と比較した。

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、①ゲノム上の異なる領域を用いて作成された系統樹を比較することにより、遺伝子組換えが起こったことならびにその系統樹上での位置を推定できる方法の開発、②アミノ酸配列レベルに働く自然選択圧の検出において、アミノ酸配列で多重整列を作成してからそれをコドン配列に変換してすることによる非同義置換速度同義置換速度比の推定、③任意のアミノ酸置換に働いた自然選択圧の検出方法の開発を行った。

(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を作成し、ELISA法、ウェ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クエンスデータを基に系統樹解析結果を比較した。

#### (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、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、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。

#### (5) 環境材料からの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(BSA-PEG ATPS法)による濃縮法を検討した。さらに、実験的にノロウイルスを汚染させたステンレス板から、ふきとり法によってどの程度ノロウイルスが回収できるか検討した。

#### (6) 新たに報告されたプライマーによる食品・患者からのサポウイルスの検出

高感度なサポウイルス検出系を確立するために、河川水からのサポウイルス検出を目的に新たに設計されたプライマーを用いたnested RT-PCRについてアサリ中腸腺および感染性胃腸炎患者からのサポウイルス検出率を従来法と比較し、その有用性を評価した。また、サポウイルス食中毒の原因食品であるアサリから得たPCR産物をクローニング後塩基配列を決定し、アサリに含まれるサポウイルスを解析した。

### 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年5月15日から2011年3月10日の間に20の道府県でノロウイルス陽性と確認された469検体を対象として、RNA抽出、逆転写反応後、PCR法によりノロウイルス遺伝子を増幅した。ダイレクトシークエンス法により395株のノロウイルスの全塩基配列を決定した。得られた塩基配列を基に、ゲノム全長、ORF1, 2, 3の各ゲノム断片についてMEGAを用いて分子系統樹解析を実施した。MEGAを用いてゲノム全長のBootscreening-plot解析を行い、組換え点を推定した。RDP3 software packageに搭載されているゲノム組換え解析ツールを用いて、モザイク構造や組換え点の確からしさを検証した。配列集団の遺伝距離の算出はMEGAを用いた。ノロウイルス 蛋白質アミノ酸配列

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。情報エントロピーは自作プログラムを用いて算出した。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。カプシド蛋白質の立体構造モデルは、ホモロジーモデリング法により構築した。モデリングには、MOE (Chemical Computing Group Inc., Canada) に搭載されているプログラムを用いた。

#### (2) カリシウイルス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

また、ノロウイルスやサポウイルス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、サポウイルスカプシド蛋白質について 1D-3D プロファイル法、エントロピー解析、分子動力学計算等による解析を行った。

#### (3) 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、ボカウイルス、A 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、血液を用いて E 型肝炎ウイルス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)

#### (4) A 型肝炎の分子疫学的研究

2010 年～2012 年に我が国で発生した A

型肝炎患者から採取された糞便および血清から検出された A 型肝炎ウイルス 139 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) 食中毒事例におけるノロウイルス関与

複数のノロウイルス遺伝子型が検出された、カキ喫食歴のないノロウイルス食中毒事例について、複数の遺伝子型のノロウイルスの検出意義等について分子疫学的に解析した。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い、流行規模との関連性を調べた。

##### (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

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、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。

### (4) E型肝炎ウイルスの安定性、抗原性および感受性の研究

培養細胞で増殖させた G1, G3 および G4 E 型肝炎ウイルスをそれぞれ加熱処理 (60°C, 5 分, 60°C, 10 分, 65°C, 5 分, 65°C, 10 分)、次亜塩素酸ナトリウム処理 (62.5ppm~1000ppm の次亜塩素酸ナトリウムと混合して室温 30 分間反応) または紫外線照射処理 (10, 20, 30, 60, 120 分間, 50uw 強度の紫外線で照射) した後、PLC/PRF/5 細胞に接種し、培養上清を 3~4 日おきに採取した。細胞培養上清のウイルス抗原、およびウイルス遺伝子を測定し、感染性を評価した。

G5 E 型肝炎ウイルス ORF2 を RT-PCR 法で増幅後、組換えバキュロウイルスを作成し、Tn5 細胞で構造蛋白を発現させ、ウイルス様粒子 (E 型肝炎ウイルス-LPs) を作製した。E 型肝炎ウイルス-LPs をウサギとモルモットに免疫し、抗 E 型肝炎ウイルス-VLPs 抗体を得た。E 型肝炎ウイルス-LPs を用いて抗体検出 ELISA 法を、抗体を用いて抗原検出 ELISA 法をそれぞれ樹立し、G5 E 型肝炎ウイルスの抗原性を

G1, G3, G4 E 型肝炎ウイルスと比較した。

G1, G3, G4 の 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に接種し、経時的採取した血清および糞便を対象にウイルス遺伝子、抗体、ALT/AST を測定し、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て 3 か月間観察した。

(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、個人情報等を厳格に管理、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) 検討パンソルビン・トラップ法による食品中の病原ウイルス検査の実用化

ノロウイルス 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ノロウイルス GII/4 ウサギ血清が約 80%、Gammagard が約 25 %で、ほぼ同等の回収率が得られた。ガンマグロブリン製剤のうち最も回収率が高かった Gammagard での回収は、ノロウイルスでは 13 遺伝子型、サポウイルスでは人に感染する 4 遺伝子グループ、さらには A 型肝炎ウイルスとアデノウイルス 41 型で有効であることが確認された。

市販のパンソルビンと自家製の相当品を用いての回収率は、市販パンソルビンは 19%~56%、相当品は 57%~94%で、自家製の相当品は市販パンソルビンと同等以上の回収率を示した。

本法で得た PCR 増幅産物のシーケンス解析を可能とするために、逆転写反応専用のプライマーを新たに設計し、それを用いた逆転写反応で得た cDNA を鋳型に PCR を行い、塩基配列を決定した。その結果 GI/4 と GII/4 のいずれも 35 コピー/g の汚染レベルまで明瞭な増幅バンドが認められ、増幅産物の塩基配列は添加したウイルスと同一であることが確認された。

(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 月に発生した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」からノロウイルス GI(102 コピー/g)とノロウイルス 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 でノロウイルス 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)

また、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)のうち 4 検体で nested real-time PCR で陽性となり、そのうち 3 検体がシーケンス検査可能で、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。

(平成 24 年度総括・分担研究報告書)

### (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。

(平成 24 年度総括・分担研究報告書)

### (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

新たに 18 株のノロウイルス全塩基配列解析に成功した。18 株には、データベースに報告されていないノロウイルス遺伝

子型, GI. 13, GI. 10, GI. 19, GII. 5, GII. 6, GII. 11, GII. 12, GII. 14, GII new 遺伝子型 HK299, Yuzawa2011 が含まれている。これらの全長配列の解析により, 全 GI, GII 遺伝子型 クラスターの内, 約 70% の全長配列が明らかにされた。ノロウイルスキメラウイルス解析に必要な, ORF1 にコードされる RdRp 領域から, 新規遺伝子型を報告するために必要な完全長 ORF2 (VP1) 領域までの約 3.2Kb を増幅するプライマーセットおよびそれに対応した標準プラスミド DNA を構築した。

(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

ACP 法で野菜・果実類, 穀物類, 食肉・魚肉類では, 効率良くウイルスが回収されたが, 小豆あん, ひじきの煮物等一部の食品では回収率が低かった。低回収率の食品のうち, ロースハムではアスコルビン酸の添加, 油脂含有食品ではイソアミルアルコール処理, 冷凍ラズベリーでは食品洗浄液を 3% ビーフエキス加 PBS (-) に変更することにより回収率の改善が認められた。3% ビーフエキス加 PBS (-) の使用や食品残渣除去に 10,000rpm の遠心を行うことで, さらなる回収率の向上が得られることが一部の食品で確認された。

(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

アミラーゼ直接法とリパーゼ直接法による検出率はアミラーゼ直接法が高かつ

たが, カキの採取月 (1 月~3 月) はリパーゼ直接法が高い傾向を示した。アミラーゼ処理とリパーゼ処理に PEG を加えた方法の比較では, 前者の検出率は高かった。それぞれの方法で得られた中腸腺 1g あたりのコピー数はアミラーゼ直接法が 9.0 コピー, 細胞破砕法が 3.1 コピーであったが, 統計学的有意差は認められなかった。細胞破砕法における乳剤濃度および破砕条件を検討した結果, 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。

(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

プラーク法により F フェージは, カキ 77 検体中 11 検体から検出された。一方, リアルタイム PCR 法では, カキ 114 検体中, II 群フェージは 44 検体, III 群フェージは 49 検体から検出された。リアルタイム PCR 法における II 群フェージとノロウイルス GII の一致率は 75.0%, II 群フェージとサポウイルスの一致率は 78.4% であった。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は 0.76 と正の相関がみとめられた。

(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

ゲノム上の異なる領域を用いて作成された系統樹を比較することにより, 遺伝子組換えが起こったことならびにその系



統樹上での位置を推定できる方法を開発した。

アミノ酸配列レベルに働く自然選択圧の検出において、アミノ酸配列で多重配列を作成してからそれをコドン配列に変換して非同義置換速度/同義置換速度比を推定すると、比が過大推定されることを明らかにした。

任意の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。

(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

3年間でサポウイルス 10 株 (GI. 3, GI. 6, GI. 7, GII. 3, GII. 4, GII. 7, GIV) 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。発現量は株ごとに異なった。

(村上研究分担報告書)

GI. 1 (Mc114 株)，GI. 5 (Yokote1 株)，GI. 6 (Nichinan 株)，GII. 3 (Syd53 株)，GIV. 1 (Syd3 株)，GIV. 1 (Yakumo8 株)，および GV. 1 (NK24 株) の VLPs を免疫源としてモノクローナル抗体の作製を試みたところ、すべての遺伝子群に反応するモノクローナル抗体および各遺伝子群特異的に反応するモノクローナル抗体を得た。

(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メ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%に向上した。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。

(平成 23 年度総括・分担研究報告書)

### (4) 食品媒介ウイルスの簡便な同時検出法の開発

SetA (ノロウイルス GI, ノロウイルス G II, サポウイルス, アストロウイルス), SetB (アイチウイルス, ボカウイルス, パレコウイルス) および SetC (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 組のマルチプレックスの蛍光 PCR 系により 10 種類の胃腸炎ウイルスを検出する方法を開発した。SetA, B, C とも検出対象ウイルス以外のウイルスとの交差反応は認められなかった。2010/11 年から 2012/13 シーズン前半までの集団胃腸炎事例 (37 事例 112 検体) について検討した結果、原因ウイルスとして、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。複数のウイルスが検出された例が 6 事例あった。マルチプレックス PCR 法の反応時間短縮を目的に AmpliTaq Gold Fast PCR Master Mix, UP と Multiplex PCR Assay Kit を比較した結果、ほぼ同等の結果が得られた。

(重本研究協力報告書)

ノロウイルス以外の腸管系ウイルス6種(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, アデノウイルス, エンテロウイルス)を2つのマルチプレックス・リアルタイムPCRで検出する系を検討した結果, アニーリング温度を57°C, プライマーおよびプローブの濃度を各0.2μMの条件に設定することで良好な検出感度が得られた。本法により, 小児散発例患者の糞便122検体中59検体および食中毒等の集団発生64事例598検体中5事例11検体からウイルスを検出した。検出ウイルスの遺伝子型を調べた結果, 様々な遺伝子型のウイルスを検出していることを確認した。

(小和田研究協力報告書)

#### (5) 環境材料からのウイルス検出法の開発

BSA-PEG ATPS法により, ノロウイルスはBSA層に濃縮された。本法によるリン酸緩衝生理食塩水への $10^4 \sim 10^5$ 個のノロウイルスの添加回収試験で37~85%の回収率が得られた。

$10^4 \sim 10^5$ 個のノロウイルスとBSA, サラダ油が含まれる汚染試料をステンレス板に塗布し, 乾燥後に得たふきとり検体から, BSA-PEG ATPS法によりノロウイルスの検出を行った。滅菌ガーゼを使用したふきとり法では, 4%と回収率が低かった。一方, ガーゼへ直接汚染試料を添加した場合に回収率は75%であった。

(田村研究協力報告書)

#### (6) 新たに報告されたプライマーによる食品・患者からのサポウイルスの検出

河川水からのサポウイルス検出を目的に開発されたプライマーを用いたnested RT-PCRはアサリおよび胃腸炎患者糞便のいずれを対象とした場合でも従来法より検出率が高かった。しかし, 新規法はアストロウイルス1型とも反応し, サポウイルスとはほぼ同じ分子量のnested PCR産物を生成した。アサリから検出されたサポウイルスのPCR増幅産物をクローニング後シーケンス解析を行った結果, アサリ個体間で異なる遺伝子型のサポウイルスが検出される例があること, 同一のアサリから異なる遺伝子型のサポウイルスが検出されることがあった。胃腸炎患者検体では新規法の結果はリアルタイムRT-PCRの結果ともほぼ一致した。

(飯塚研究協力報告書)

### 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

2006/07~2010/11シーズンに検出されたGII.4は8種類の亜型に分類された。そのうち2006/07シーズンの大流行の主要原因であるGII.4 2006bが5年間流行を維持し, 他の7種は局地的かつ短期的な流行に止まった。8種の亜型のうち, 少なくとも5種類はORF1とORF2の境界を組み換え部位とするモザイク(組み換え型)ウイルスであった。2006bは5年間でゲノムの多様性は増加したが, 多くは同義置換でアミノ酸置換は強く抑制されていた。

ゲノム情報を基に, 任意のノロウイルスのカプシドの分子モデルを迅速に構築