

する系を確立した。これを用いて GII.4 流行株を分析したところ、カプシド蛋白質 P2 領域の変異は、想定される感染受容体結合部位の周辺に配置されることが判明した。また、P2 領域のアミノ酸置換の数は 2006b 及び 2004/2005 で最も多く、過去の GII/4 流行株には見られない特徴的なアミノ酸置換が 7 カ所特定された。

(佐藤研究分担報告書)

(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

サポウイルス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。

そのサポウイルスカプシド二量体分子モデルを用いて 1D プロファイルと 3D プロファイルで解析したところ、大きい共分散を示す部位は、カプシド全体に存在し、比較的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。サポウイルスカプシドの分子動力学計算を行った結果、P2 ドメインの RMSF は大きく、約 4Å~10Å の部位が 5 つあり、これらは抗体等と結合しやすいと考えられる。S ドメインや P1 ドメインではそれぞれのドメイン内の残基は正の相関運動を示すものが多く、P2 ドメインでは F383 を含むループや I428 を含むループのループ内は正の相関運動を示し、P1 ドメインとは負の相関運動を示した。

(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 2010 年 1 月~2012 年 3 月に採取(買取)された国産生食用カキ 26 ロット中 12 ロット(46.2%)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 2010 年 1 月~2012 年 12 月に下水処理施設で採取された 90 検体のうち、合流水 41 検体ではノロウイルス GI が 37 検体、ノロウイルス GII が 38 検体、アストロウイルスが 32 検体、サポウイルスが 4 検体から、分流水 49 検体ではノロウイルス GI、ノロウイルス GII が 49 検体すべてから、アストロウイルスが 43 検体から、サポウイルスが 15 検体から検出された。合流水と分流水のノロウイルス GI 型、ノロウイルス GII 型、アストロウイルスのコピー数を比較すると、雨水を含まない分流水は雨水を含む合流水よりもウイルス量は 10~100 倍高い値を示した。

2010 年 11 月~2011 年 3 月に購入した生カキの中腸腺 30 検体とパック内浮遊水 15 検体から、ノロウイルス、アストロウイルス、サポウイルス、エンテロウイルス及び A 型肝炎ウイルス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 2010 年 1 月~2012 年 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发例)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ノロウイルスおよびサポウイルスの検出を行った。患者および下水からノロウイルス GII.4 が最も多く検出された。GII.4 の 2006b 亜型は 3 年間にわたり検出されたが、

2012/13 シーズンには新たな 2012 亜型が流行した。ノロウイルスの GI, 特に GI.4 は下水から多数検出されるものの、患者からの検出は少なかった。2011 年 6 月にはノロウイルス GII/2 が患者、下水、岩ガキの全てから検出された。2003～2011 年のノロウイルスを調査したところ、多数のキメラウイルスの存在が確認された。

(名古屋研究協力者報告書)

④ 堺市において、2010 年 1 月～2012 年 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。臨床材料からは 8 種類、環境検体からは 18 種類の遺伝子型のノロウイルスが検出された。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、環境検体からはどの定点からも通年にわたり検出された。

(内野研究協力者報告書)

⑤ 岩手県において 2008/09～2012/13 の 4 シーズンに下水処理場で採取された下水流入水および放流水から各種胃腸炎ウイルスの検出を試みた。その結果、流入水からノロウイルス GI および GII, サポウイルス, エンテロウイルス, アデノウイルス, アストロウイルス, アイチウイルス, A 群ロタウイルスが検出された。ウイルス量および検出ウイルスの種類は少ないものの放流水からも検出された。垂下カキからも、ノロウイルス以外に、サポウイルス, アイチウイルス, エンテロウイルスが検出され、下水処理施設流入水, 放流水での検出状況を反映するものであった。

(森田研究協力者報告書)

⑥ 佐賀県において 1 下水処理場で 2010 年 6 月～2011 年 12 月に流入水を採取し、ウイルス検索を行った結果、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, アデノウイルスが検出された。平成 22 年度の調査ではサポウイルスは検出されなかったが、平成 23 年度サポウイルス検出プライマーなどを改変した結果、高頻度にサポウイルスが検出された。

(平成 22 年度および平成 23 年度総括・分担研究報告書)

⑦ 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。

(平成 24 年度総括・分担研究報告書)

⑧ 熊本県において、nested RT-PCR 法を用いて、県内のイノシシ, シカ及びブタの E 型肝炎ウイルス汚染実態調査を行った。イノシシ 173 頭中 13 頭 (7.5%) 及びブタ 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。イノシシから検出された E 型肝炎ウイルスの遺伝子型は、地域特異的に 3 型 (G3) と 4 型 (G4) に分かれた。ブタの E 型肝炎ウイルスは G3 のみで、各養豚場に特異的であった。ブタではと畜検査で合格となっ

た肝臓 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た。

ELISA 法により、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。Specific Pathogen Free (SPF) ブタは 101 頭中 12 頭 (11.9%)、一般ブタは 865 頭中 683 頭 (79%) が抗 E 型肝炎ウイルス-IgG 抗体陽性で、保有率に大きな差があった。

(原田研究協力者報告書)

(4) A 型肝炎の分子疫学的研究

2010 年は 59 株について解析した結果、遺伝子型 IA が 42 株、IB が 1 株、IIIA が 16 株であり、その大部分は IA の 2 つのクラスターと IIIA の 1 つのクラスターに分類された。2011 年は 52 株について解析した結果、遺伝子型 IA が 46 株、IIIA が 5 株、IIIB が 1 株であり、IA の大部分は千葉市における集団食中毒事例のものであり、この株は IA-1 に属した。2012 年は 28 株の解析を行った結果、遺伝子型 IA が 21 株、IB が 2 株、IIIA が 4 株、IIIB が 1 株であった。

(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) 食中毒事例におけるノロウイルス関与

疫学的調査でカキ喫食歴のない集団ノロウイルス感染事例で検出されたノロウイルス重感染例から GI. 4 と GII. 3 のノロウイルス遺伝子が検出された。また、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。

(田中研究分担報告書)

(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～2012 年 12 月に発生した胃腸炎集団発生 1,825 事例のうち 1,056 事例 (57.9%) からウイルスが検出され、そのうち 1,000 事例はノロウイルス、56 事例 (5.3%) はその他のウイルスが関与した。ノロウイルス以外のウイルス検出事例のうち、食品の関与が推定される集団胃腸炎はサポウイルスによるものが 26 事例、A 群ロタウイルス群によるものが 23 事例であった。

(森研究協力報告書)

② 大阪市において 2001 年 1 月～2012 年 3 月に発生したカキ関連事例について腸管系ウイルスおよび A 型肝炎ウイルスの検索を行った。その結果、ノロウイルス以外に 5 種類のウイルス (アイチウイルス、アストロウイルス、サポウイルス、A 群ロタウイルス、エンテロウイルス) が 26 事例 (29.5%) 40 検体 (14.0%) から検出され、ノロウイルス以外に少なくとも 5 種類のウイルスの感染リスクがあることが示された。

(入谷研究協力報告書)

③ 北海道において 2000 年 7 月～2012 年 8 月に発生した集団胃腸炎事例 287 事例を調査した。二枚貝関連事例では、ウ

ウイルス陽性 49 事例のうち、ノロウイルスのみの検出事例は 28 事例 (57%)、ノロウイルスと他のウイルスが検出された事例が 20 事例 (41%) あった。検出ウイルスは、多い順にノロウイルス、アイチウイルス、サポウイルス、アストロウイルス、エンテロウイルスで、関連食品 (二枚貝) からは、ノロウイルス、サポウイルス、アイチウイルス、アストロウイルス、A 群ロタウイルスが検出された。非二枚貝関連の食中毒疑い事例では、ノロウイルスのみまたは主にノロウイルスが検出された事例が 96% を占めていたが、ノロウイルス以外のウイルスとしてサポウイルスと A 群ロタウイルスの単独感染事例が 1 事例ずつ認められた。サポウイルスと A 群ロタウイルスは、中学生以上の年齢層の感染症疑い事例においてもノロウイルスに次いで多く検出された。

(吉澄研究協力報告書)

④ 長野県において 2006 年～2010 年に発生した二枚貝 (カキ) 関連食中毒 4 事例のうち、患者等糞便 35 検体からノロウイルス以外にサポウイルス (17.1%)、アイチウイルス (14.3%) が、原因食品として疑われた加熱調理用カキの同一ロット品 10 検体からノロウイルス以外に、アイチウイルス (4/10) およびアストロウイルス (4/10) が検出された。

(平成 22 年総合・分担研究報告書)

⑤ 新潟県において、2008 年～2010 年 3 月に発生した生カキ関連食中毒事例 7 例の患者便等 34 検体のうち、7 事例中 2 事例、34 検体中 3 検体からアイチウイルスが検出した。同事例からノロウイルス、サポウイルス、アストロウイルスは検出

されなかった。

(平成 22 年総合・分担研究報告書)

(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ノロウイルス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 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 1 月給食弁当を原因食とする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。2009 年 4 月から 2012 年 3 月までに感染症発生动向調査の病原体定点で採取された散发性感染性胃腸炎患者の糞便および吐物、計 834 検体中 352 検体 (42.2 %) からノロウイルスが検出された。そのうち 10 検体 (2.8 %) が GI 陽性、342 検体 (97.2 %) が GII 陽性であり、GII が大半を占めた。主流遺伝子型は、2009/10 および 2011/12 シーズンが GII. 4, 2010/11 シーズンが GII. 3 で、シーズンにより変動を認めた。2010 年の GII. 3 は GII. 12-GII. 3 のキメラウイルスであった。

(小林研究協力報告書)

(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

G1 E 型肝炎ウイルス の PLC/PRF/5 細胞

での増殖を確認した。G1 E 型肝炎ウイルスは同細胞で継代可能で、ウイルスの増殖速度は継代と共に速くなる傾向がみられた。

G1 E 型肝炎ウイルスは、G3 E 型肝炎ウイルスや G4 E 型肝炎ウイルスと同様に 50 μ w 強度で 30 分間の紫外線照射、125ppm 以上の濃度で 30 分間の次亜塩素酸ナトリウム処理、あるいは G3 E 型肝炎ウイルスと同様に 60°C10 分間、65°C5 分間以上の熱処理で不活化された。アルコール、クロロホルムに対しては抵抗性であった。ウイルスと血漿を混合して加熱処理する場合、ウイルスの不活化効果に影響が見られた。

G5 E 型肝炎ウイルス-LPs を用いて G1, G3, G4 E 型肝炎ウイルスに感染した E 型肝炎患者血清から、それぞれの E 型肝炎ウイルス-LPs を用いる場合と同じ感度で特異的 IgG および IgM 抗体を検出した。また、G5 E 型肝炎ウイルス-LPs をウサギとモルモットに免疫して得た抗 G5 E 型肝炎ウイルス-LPs 抗体を用いた抗原検出 ELISA により G1, G3, G4 E 型肝炎ウイルスを高感度で検出できた。

G1, G3, G4 E 型肝炎ウイルスを接種したラットから抗 E 型肝炎ウイルス IgG, IgM 抗体, E 型肝炎ウイルス RNA は検出されず、ALT の上昇もなかったことから、ラットは E 型肝炎ウイルスに対し、非感受性であると推測された。一方、ラット E 型肝炎ウイルスの接種では、抗ラット E 型肝炎ウイルス IgG と IgM 抗体が検出され、便中にラット E 型肝炎ウイルス RNA が検出され、さらにラット E 型肝炎ウイルス汚染ケージで飼育されたラットにも

E 型肝炎ウイルス感染を示唆する結果が得られたことからラット E 型肝炎ウイルスは糞口感染することが示された。しかし、ALT の上昇が認められなかったことからラット E 型肝炎ウイルスは肝炎を引き起こさないことが推測された。

(李研究分担報告書)

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・トラップ法による食品中の病原ウイルス検査の実用化

本法の大きな課題のひとつとして、検査に不可欠な抗体やパンソルビンの安定供給体制の確立があった。この問題を解決するために、ガンマグロブリン製剤の導入を試み、その有用性を確認するとともに汎用プロトコルを完成させた。これによって、抗体の量的な制約は解消されるとともに、ノロウイルス以外のサポウイルス、A 型肝炎ウイルス、アデノウイルス 41 型といった多種類の食中毒起因ウイルスへの対応が可能になった。また、パンソルビン相当品の自家調製プロトコルによって、試薬の在庫切れや製造中止といったリスクを回避できるようになり、コスト負担も低減できた。

一方、本法で得た増幅産物にはブドウ球菌由来の遺伝子の影響により、シーケンス解析が困難であるという課題があったが、逆転写反応専用プライマーを使うことで、ウイルス由来 RNA の特異的な増幅が可能となった。ノロウイルス GI/4 型及びノロウイルス GII/4 型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。

(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 月の大阪府堺市食中毒事例の関連食品からノロウイルス GI 型を検出し、2012 年 3 月の島根県浜田市の食中毒事例においても食品からノロウイルス GII 型を検出し、シーケンス解析により遺伝子型別を実施することができた。

以上の (1)、(2) の研究から、パンソルビン・トラップ法を実際の食中毒事例に適用できる食品検査法に改良するという目的は達成された。

(3) パンソルビントラップ法の多機関評価試験

本法による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考えられた。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

ポリメラーゼ領域から VP1 の全長約 3.2Kb を増幅する第 2 世代プライマーセットは、nested PCR では SK シリーズを用いたコンベンショナルな RT-PCR とほぼ同等の感度を有した。また、1st PCR 産物はこれまで構築された様々な PCR 検出系の増幅領域をカバーしており、SK シリーズ増幅産物を用いた従来のカプシド N/S 領

域の遺伝子型別、RdRp 領域を用いた遺伝子型別、キメラウイルスの解析、ゲノム全長において最も多様性に富む VP1/P2 ドメインを用いた分子疫学にも対応できる。今後、GI、GII の混合感染事例まれな遺伝子型に対する検討を行うとともに、多くの検出株で評価試験を重ねる必要がある。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国内だけでなく、国際的にも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

ACP 微粒子を用いた簡便で迅速なウイルス回収・濃縮方法の構築を検討した結果、食品洗浄に BE 加 PBS および Tris-glycine 液を使用することで、ウイルス回収が困難とされる冷凍果実類や油脂含有食品を含む多くの食品から効率よくウイルスを回収・濃縮できることが判明した。一方、食品洗浄液に均一に混ぜざるような食品（小豆あんやシュークリーム）、強力な酵素阻害物質を含有すると考えられる食品（ひじき）等からはウイルスの回収が困難であることも示された。このような食品の処理方法については今後もさらに検討をする必要がある。

(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では、12 月採取カキではアミラーゼ直接法の検出率が高く、1 月～3 月のカキではリパーゼ直接法の検出率が高い傾向が認め

られた。この原因として時期によるカキ体内の構成成分の影響が考えられた。アミラーゼ処理 PEG 沈澱法とリパーゼ処理 PEG 沈澱法の比較では、5 倍以上アミラーゼ処理 PEG 沈澱法が高い検出率を示した。この理由として、一般に PEG 法は pH 酸性下で濃縮効果が低下する傾向があることから、酸性緩衝液を用いるリパーゼ直接法の検出率が低かったこと等が考えられた。改良細胞破碎法で乳剤濃度を下げることおよび破碎条件を緩和にすることで検出率の向上が図れたが、この要因として、ウイルスの溶出効率が高まる、カキ中の酵素反応等の阻害の影響が低下するなどが考えられた。

(7) ヒト糞便由来ウイルス汚染指標のためのカキ中の F 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、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 77 検体中、11 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、109 検体中Ⅱ群フェージは 44 検体、Ⅲ群フェージは 49

検体が陽性であった。MS2 フェージを用いた実験では、不活化されていない F フェージは、リアルタイム PCR のコピー数とプラーク数がほぼ同じ値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 フェージが存在する可能性が推測された。感染性 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 0.76 と正の相関がみられたことなどから、Ⅱ群フェージと腸管系ウイルスの検出は相関があることが示唆された。このことは、F フェ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

遺伝子組換えが起こったこと並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。この方法は組み換え型のノロウイルスの検出に応用できると考えられ、遺伝子型分類システムの開発に寄与するものと思われる。

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後、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ので、この方法は推奨されないと考えられた。

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。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

これまでに得られていた 7 つの遺伝子型の他に、新たに 4 つの遺伝子型に属する VLPs を作出した結果、これまでに報告されている 16 の遺伝子型の約 70% をカバーする VLPs パネルが得られた。しかし、まだ作出できていない遺伝子型があることから、今後も VLPs パネル作成を継続する必要がある。

遺伝子群特異性抗体および各遺伝子群に反応する抗体が得られたことから、ELISA 法あるいはイムノクロマト法などによるサポウイルス検出系あるいは遺伝子群鑑別検査系の構築が可能と思われる。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 A 型肝炎ウイルス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) 食品媒介ウイルスの簡便な同時検出法の開発

胃腸炎ウイルス 10 種（ノロウイルス G I, ノロウイルス 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, A 群ロタウイルス, C 群ロタウイルス, アデノウイルス）を 3 つの反応系で包括的に検査できる蛍光 RT-マルチプレックス PCR 法を開発した。本法は、増幅 DNA の発色と分子量で検出ウイルスを容易に判別できる。本法を食中毒や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。

サポウイルス, アストロウイルス, C 群ロタウイルスの同時検出系および A 群ロタウイルス, アデノウイルス, エンテロウイルスの同時検出系の 2 種類の Multiplex real-time PCR 法を設計し、検討した結果、短時間で様々な遺伝子型の腸管系ウイルスが検出可能であり、発生动向調査および集団発生時の緊急検査に有用であると考えられた。本法により、

ノロウイルス以外の様々な腸管系ウイルスが福井県内に潜伏していることが示唆された。集団発生ではノロウイルスが多数を占めるため、ノロウイルスの検査後に他の腸管系ウイルスの検索を実施することが効率的であると考えられた。

これらのマルチプレックスの検査系は、短時間で様々な腸管系ウイルスの検査が可能であり、二枚貝事例やノロウイルスの検出率が低い場合などで、ノロウイルス以外のウイルスの関与が示唆される場合、有用な手法になると考えられる。

(5) 環境材料からのウイルス検出法の開発

BSA-PEG ATPS 法で清浄な液体に存在するノロウイルス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。

一方、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、滅菌ガーゼを用いたふきとり法と BSA-PEG ATPS 法による濃縮法でノロウイルスの回収を試みたが、回収率は4%と低かった。この原因として、汚染ステンレス板の作製過程でウイルス粒子が壊れる可能性が考えられ、汚染モデルの作製方法の検討が必要と思われた。

(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

環境水からのサポウイルス検出および遺伝子解析に有用な新規法を食用貝や胃腸炎患者検体に適用したところ、従来法

と比較して高い検出率を示し、その有用性が確認された。しかし、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ことから、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。

アサリ個々の中腸腺から検出されたサポウイルスの遺伝子解析結果から、特定の貝(個体)の抜き取り検査を行う場合、必ずしも患者と同一の株(塩基配列)の検出に至らない可能性があることが示された。この問題は環境水を通じて多様な遺伝子型のウイルスを蓄積すると思われる食用貝の解析に共通する問題として、今後の食中毒検査の技術的な注意点として留意が必要である。

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

全ゲノム解析の実施により、過去5年間、GII.4 2006b が国内で最も優勢なウイルスとして全国的な流行を繰り返したことを明らかにした。ゲノムの多様性の蓄積に反して、アミノ酸配列の置換はカプシド蛋白質においても、抑制されていた。この理由は不明であるが、2006/07 シーズンの流行時点ですでに感染・増殖能、免疫感受性、感染伝播能力等において最高レベルの生存能力を獲得していた可能性が考えられた。

GII.4検出株の大半は、ゲノムがモザイクゲノム構造をとることが明らかになった。この知見は、ゲノム全長の解析により初めて明確になったもので、疫学的、

ウイルス学的に重要な発見であると考えられる。この組み換え部位として ORF1/ORF 境界領域が特定された。この部位はゲノムの保存性が高く、組み換え部位としての必要条件を満たすが、その他にこの領域で組み換えが起りやすい理由として、組換え反応を促進する特殊な RNA 高次構造を形成する可能性が考えられる。また ORF1 と ORF2/3 を交換したウイルスは他の領域の組み換えウイルスより生存能力が高い可能性もある。今回得た 395 株のノロウイルス GII 株の全ゲノム情報は、ノロウイルスの分類法の検討に寄与すると思われる

GII.4 2006b は、カプシド蛋白質 P2 領域に 7 カ所のアミノ酸置換を獲得していた。この比較的多くの変異がこのウイルスの抗原性等を独特のものとし、全国的に流行した要因の一つになった可能性がある。

一方、GII.4 2006b の長期にわたる流行の継続は、抗原変異の獲得では十分に説明できない。GII.4 2006b は 5 年間流行したが、カプシドのアミノ酸置換は強く抑制され、抗原変異の獲得で集団免疫を逃避しているとの証拠は得られなかった。これらの結果から、GII.4 2006b のカプシドには、中和抗体の淘汰圧が十分作用していない、すなわちこのウイルスのカプシドは抗体逃避能力が優れているか可能性がある。

(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

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った結果、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が明らかになった。1D-3D プロファイル解析、エントロピー解析、動的性質の情報を組み合わせることで、より予測精度が上がる可能性が高くなると考えられた。

(3) 食品、動物、環境の汚染実態調査

大阪市の調査で 2010 年～2012 年市販されていた生食用カキの約 46% からノロウイルスが検出されたことから、今後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。

富山県の調査における 3 年間の患者、下水、カキ等の調査で、ノロウイルス GI.4 は、下水から多数検出された。これは、これまでの調査 (Iwai et al., Appl Environ Microbiol 75:1264-1270, 2009) と同様の結果であった。一方、患者からの検出が 1 例のみであったことから、GI.4 は病原性が低く、不顕性感染が多いと推測される。ノロウイルス GII.2 は 2011 年 6 月に患者、下水、岩ガキ全てから検出されたことから、この時期にヒト、環境、岩ガキの中で循環していたと考えられる。2003 年以降 12 種類のキメラ型のノロウイルスが確認された。ノロウイルス GII.2 や GII.3 の一時的な流行 (2005/06, 2009/10, 2010/11 シーズン) にキメラウイルスが関与した可能性が示唆された。

堺市の調査で、臨床検体では 8 種類、環境検体では 18 種類と多様なノロウイルスが検出された。また、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、環境検体からはどの定点からも通年にわたり検出された。これらのことから、感染性胃腸炎として表面化しないウイルスの浸淫が多く存在する可能性が示唆された。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、胃腸炎患者数の少ない時期および患者数増加の初期には、ウイルスは下水処理施設の処理工程中に効果的に除去されるが、患者数増加が継続すると、一部が除去されず、放流水中のウイルスが増加すると考えられた。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ノロウイルスなどの感染や流行の発生動向を推測できる結果が得られた。

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。

イノシシおよび豚から検出された E 型

肝炎ウイルスの遺伝子型はイノシシでは捕獲地域ごとに、豚では養豚場ごとに特異的であった。このことから、イノシシでは捕獲地域毎に、ブタでは養豚場毎に非常に類似した遺伝子を有する E 型肝炎ウイルスが浸淫しているか、または地域や養豚場毎に E 型肝炎ウイルス遺伝子に変化した可能性が考えられた。

と畜検査で合格となったブタ肝臓の 2.5% から E 型肝炎ウイルス遺伝子が検出された。平成 24 年 7 月 1 日から生食用牛肝臓の販売禁止を受け、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り、生食の危険性を消費者にさらに周知徹底する必要がある。

ブタ血清中の抗 E 型肝炎ウイルス-IgG 抗体の保有率が養豚場間で大きく異なっていたことなどから、飼育形態や飼育環境など複数の要因が E 型肝炎ウイルス汚染率に影響するものと考えられた。また、この結果は、適切に飼育すれば E 型肝炎ウイルスの汚染のリスクを軽減できる可能性を示唆する。

(4) A型肝炎の分子疫学的研究

2010 年の A 型肝炎多発の要因は、従来我が国で常在していた遺伝子型 IA (IA-1) に加え、フィリピンとの関連が示唆される株 (IA-2) および韓国で流行している IIIA が関与し、特に IA-2 は共通の汚染源による diffuse outbreak である可能性が高いと考えられた。この IA-2 は二次的拡大はせずに収束し、2011 年にはほぼ消失したものと推定される。2011 年の千葉市の集団事例では、原因施設 (寿司店) を特定することができた。このような解析が可能であった理由として、医療機関から

の迅速な届出や入院患者の調査への理解により迅速な解析ができたこと、分子疫学的解析の情報共有ができたことなどが考えられる。

IIIA に属する株は 2010 年以後 2012 年まで検出されており、地域的な偏りは見られていないことから、日本への定着が懸念される。

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、今後もこのようなサーベイランスシステムを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) 食中毒事例におけるノロウイルス関与

2010 年のカキ非関連集団事例でみられた重感染事例から検出されたノロウイルス (08v534_GII. 3) がキメラウイルスであったとは予期せぬ結果であった。幸いにもこのキメラウイルスによる地域での浸淫やノロウイルス大流行の報告はない。しかし、2012/13 シーズンでは GII. 4 のキメラウイルス (GII/4 2012 変異株) が本邦のみならず世界的に大きな流行を引き起こした。今後、ノロウイルス流行が拡大した場合、ゲノムの点変異や遺伝子組み換えによる新たな変異株の出現等を想定し、サーベイランス体制を強化するとともに、全ゲノム解析等可能な限り詳細な遺伝子解析を迅速に実施することが重要である。

(2) 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ことが多いことから、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。そこで、3 年間に渡り、主に後方視的に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。

二枚貝関連事例からは、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、A 群ロタウイルス、エンテロウイルスが少なくない頻度で検出された。多くの事例は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が、これらのウイルスの単独検出事例もあった。一方、調理従事者からの二次汚染が原因と推定される食中毒事例ではノロウイルスによる事例が多くを占めた。ノロウイルス以外では、サポウイルス、A 群ロタウイルスによる事例が少なからず認められた。

現在食中毒のウイルス検査は、ノロウイルスを中心に行われており、ノロウイルス以外のウイルスの検査についての対応は地方衛生研究所により、また、各事例により様々である。今回の調査により、ノロウイルスが最も重要なウイルスであることが確認されたものの、それ以外のウイルスも特に二枚貝事例については関与することが明らかとなった。これらのことから、喫食メニューにカキ等の二枚貝が含まれる場合には、積極的にサポウイルスやアイチウイルス等の検索の実施が望まれる。調理従事者からの食品の

二次汚染が疑われる場合には、ノロウイルスの検査を実施し、ノロウイルスが検出されない場合やノロウイルスの検出率が低い場合には、その他のウイルスの検索も実施することが必要であると考えられた。その中でも特に、サポウイルスとA群ロタウイルスを第2候補とするのが適当と考えられた。

一方、アイチウイルスはノロウイルスとの混合感染例が多く、その病原性についてはさらなる検討が必要であるが、二枚貝事例においてノロウイルスに次いで多く検出されることから、アイチウイルスを検出した場合、当該事例が二枚貝関連事例であることを示す、傍証として有用であると考えられた。

(3) 地域における食品媒介事例等の疫学的研究

愛媛県の食中毒事例において、患者と無症状の調理従事者から検出された株の塩基配列が一致し、また、感染症集団発生事例から検出された株と同一の株が散发性胃腸炎から検出された。これらのことから地域で散發的に流行しているウイルスが、調理従事者等を介して調理中の食品を2次汚染し、食中毒の原因となり、また、学生寮、宿泊施設等に持ち込まれて、施設内でヒト-ヒト感染で集団発生を引き起こした可能性が示唆された。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入所者、職員等への日常の手洗い等の指導が重要である。愛媛県で検出された遺伝子型 GII. 2, GII. 3, GII. 7 及び GII. 13 の株の多くは、ポリメラーゼ領域とカプシド領域との間

で遺伝子組換えを起こしたキメラウイルスであった。

2010年の1月愛知県で給食弁当を原因食とするサポウイルスによる大規模食中毒事例が発生した。汚染経路や原因食品は特定されなかったものの、サポウイルスもノロウイルスと同様に大規模な食中毒事例の病因物質となることが示唆された。2006/07シーズンにノロウイルス GII. 4 の 2006b 亜型に分類される新たな変異株が出現し、世界的な大流行を起こして以後、2009/10シーズンまでの4シーズンの間、2006b 亜型が主流株として流行してきた。2012/13シーズンは Sydney/NSW0514/2012/AU と高い相同性を示す GII. 4 2012 変異株が主流であり、愛媛県においては10月以降の検出 GII. 4 はすべて2012変異株であった。

(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

遺伝子型が異なる G1, G3 および G4 E型肝炎ウイルスの増殖できる培養細胞系を確立した。培養細胞の樹立によって、各遺伝子型E型肝炎ウイルスの加熱処理、紫外線処理、あるいは次亜塩素酸ナトリウム等の消毒剤処理による不活化条件を明らかにした。また、新しい遺伝子型の抗原性やラットにおけるE型肝炎ウイルスの感受性を感染実験で検討した。本研究から得られた情報はE型肝炎ウイルスによる感染症や食中毒防止対策の有力な科学根拠となると考えられる。

E. 結論

1. 食品からのウイルス検出法の開発・標準化

- 食品中のウイルスを捕捉するための抗体として、ガンマグロブリン製剤を用いた汎用プロトコルを完成した。パンソルビン相当品の自家調製法を確立し、その有用性を確認した。新たに設計した逆転写専用プライマーを用いて得た cDNA の PCR 増幅産物を解析したところ、食品 1g 当たり 35 個程度のウイルスの遺伝子解析が可能であった。
 - パンソルビン・トラップ法の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を検出することに成功した。
 - 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、その精度管理が必要である。
 - ACP 微粒子を用いた食品からのウイルス検出法を開発した。食品ごとに回収率の向上を図るための改良を行い、多くの食品で回収率の改善が図れた。
 - 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での処理が有効であることを確認した。改良細胞破碎法を改良し、高感度化が図れた。
 - 新たに 18 株のノロウイルス全塩基配列解析に成功した。キメラ型ノロウイルス検出用のプライマーセットおよび標準プラスミドを新たに構築した。
 - ヒト糞便由来ウイルス汚染指標として 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 法の遺伝子定量値より低かった。しかし、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 あるいはサポウウイルスの検出はよく一致し、また II 群フェージとノロウイルス GII のコピー数もよく相関したことから、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
- 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。
 - A 型肝炎ウイルス検出 nested PCR 用のプライマーセットを新たに設計し、検出感度および分子疫学的解析能の向上が図れた。
 - SaV10 株の VLP の作成に成功した。
 - サポウウイルスのすべての遺伝子群に交差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。
 - 新しい遺伝子型 G5 および G6 E 型肝炎ウイルスの抗原性は G1, G3, G4 E 型肝炎ウイルスと類似した。
 - 10 種類(ノロウイルス GI, ノロウイルス GII, サポウウイルス, アストロウイルス, アイチウイルス, ボカウウイルス, 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) を 3 つの反応系で包括

的に検査できる蛍光 RT-マルチプレックス PCR 法を開発した。

- 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 を確立した。
- 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ノロウイルスを高感度に回収することができた。
- 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, 新規法で検出し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

- 2010 年 1 月~2012 年 3 月に採取(買取)された国産生食用カキ 26 ロット中 12 ロット(46.2%)からノロウイルスが検出された。
- 2011 年 6 月採取の岩ガキからノロウイルスが検出された。
- 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。
- 人口集落地域の放流水が集約する河口部での垂下カキによるウイルスのモニタリングは, 集落における下痢症ウイルスの動向を反映した。

- 臨床検体と比較して下水からは多様なノロウイルス遺伝子型, また多少なウイルスが高頻度に検出され, 感染性胃腸炎として表面化しないウイルスの浸淫が多くあることが示唆された。
- 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。
- 過去5年間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。
- 過去に検出されたノロウイルスについてポリメラーゼ領域とカプシド領域の塩基配列を堺市, 愛媛県, 富山県, 愛知県で調べた結果, 多くのノロウイルスはキメラウイルスであった。キメラウイルスの出現が流行規模に影響する場合があった。
- 2012/13シーズンは2012年に出現したGII.4の新しい変異株が大流行を起こした。
- サポウイルスカプシド蛋白質の1D-3Dプロファイル法等により抗原部位や機能部位と推定される部位が明らかになった。
- 国内の A 型肝炎について分子疫学的解析し, 多発の要因, 各種遺伝子型の発生動向等を明らかにした。
- 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ンでは地域特異的、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、豚 966 頭中 695 頭 (71.9%) が抗 E 型肝炎ウイルス-IgG 抗体陽性であった。

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。
- 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、アデノウイルスが検出された。
- 2010 年の 1 月愛知県で給食弁当を原因食とするサポウイルスによる食中毒事例が発生した
- 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。

- GI.4 は患者からの検出は少ない一方、下水からは高頻度で検出され、不顕性感染が多い遺伝子型と思われた。
- 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。
- 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したが、ヒト由来 E 型肝炎ウイルスはラットに感染しなかった。

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」
総合研究協力報告(平成 22～24 年度)

食中毒事例におけるノロウイルス関与

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
研究協力者	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
研究協力者	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
研究協力者	斎藤博之	秋田県衛生環境研究センター
研究協力者	野田 衛	国立医薬品食品衛生研究所
研究協力者	内野清子	堺市衛生研究所
研究協力者	三好龍也	堺市衛生研究所
研究協力者	吉田永祥	堺市衛生研究所
研究協力者	芝田有理	堺市衛生研究所

研究要旨

感染性急性胃腸炎の原因微生物の第一位はノロウイルス(NV)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、平成 22 年度には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 のキメラウイルスが検出された。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。その後平成 24 年から 25 年にかけて、GII. 4 のキメラウイルスによる集団発生がみられ、大きな NV 感染症の原因と推測された。一方、直接的な要因として、これまで食材起因の食中毒が疫学的に想定されてもウイルス汚染の特定が困難であったが、平成 23 年度には、当市の調理配給機関で作製された弁当を喫食した幼稚園 園児、職員 430 名の内 105 名に下痢、腹痛、発熱等の食中毒様症状の発症がみられた。その事例からパンソルビン・トラップ法にて保存食材から原因ノロウイルスが検出された。このパンソルビン・トラップ法は今後、食中毒予防に対する衛生基準の遵守・徹底の指標となり、食の安心・安全に大きな貢献ができると考える。

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。感染経路はヒト-ヒト感染、塵埃感染などがあるが、ノロウイルスを蓄積した二枚貝や調理従事者によって汚染された食材に起因する場合が多い。流行規模は大きく集団発生、幼稚園、保育所から福祉施設、老人介護施設まで多岐に亘る施設内感染がある。大規模な感染様式はNVの環境中の安定性のみならずNV自身が宿主の免疫淘汰から逃れるための手段として、遺伝子変異による感染力の増強や維持が大きな要因と考えられる。カキ関連NV食中毒では、カキの生活環から多数の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の多くは単一である場合が多い。

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遺伝子変異等のメカニズムを解く上で重要である。平成22年度ではカキ喫食歴のないNV食中毒事例から検出された複数の遺伝子型の意義、また平成24年度には流行株についてNV遺伝子変異の有無について解析し、流行予測や予防に寄与することを研究目的とした。また、平成23年度は、疫学的に因果関係が推測されていた食中毒事例の食材から斉藤らのパンソルビン・トラップ法にてノロウイルス遺伝子の検出を試みた。

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。また、平成24年はNV散発事例由来135株、NV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 (Kageyama, T. et al.; 2004, J Clin Microbiol 42)。

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約の 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/typingtool>) 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。

3. 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) カキ非喫食集団発生事例から得られた検体 08v534 のノロウイルス遺伝子型は GI.4/GII.3 の重感染と考えられた。しかし、GI.4 は GI.4_AB042808Chiba 40787JP 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モザイクパターンを示し、リコンビナントウイルスとして報告した。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。

一方、過去の検体を用いて上記にみられた様な組み換え体ウイルスの存在について解析した。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。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。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。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。2012 年 10 月以降 GII.Pe/GII.4 型が検出されている。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。

このように重感染と考えられていた感染は遺伝子組み換え NV であり、これらは過去から、頻度の差はあれ、発生していたことが明らかになった。特に 2012/13 のシーズンの大きな流行の要因の一つとして、学術的にはキメラ型ノロウイルスの出現と考えられた。

2) 食品中から NV 遺伝子の検出は、パンソルビン・トラップ法の開発により精度よく検出されることが可能となった。その一例として、当市で発生した食中毒事例では園児、職員、および給食提供施設従業員を含む 94 検体中、33 検体 (35%) で NV 陽性であった。遺伝子型では GI.4 29 例 (88%) が最も多く、次いで GI.3 (2 検体)、GI.14 (1 検体)、GI.4+GII. 型別不明 (1 検体) であった。保存食材からパンソルビン・トラップ法による NV 遺伝子検出試み、大人用そら豆煮物から GI first, GIIfirst でそれぞれ 102 copy/食品 1 gram, 46 copy/食品 1 gram の遺伝子が検出された。これらは nested-PCR でも検出された。しかし、GII nested-PCR では煮物 (そら豆)、大人用こんにやくキンピラからも検出された。食中毒事例として疫学的にも NV 学的検出としても因果関係が証明された一事例であった。

D. 考察

これまでの成績でも、NVGI, GII 間の重感

染の頻度はそれほど高くない。しかし明らかなカキ喫食歴の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った。一本鎖 RNA ウイルスの Genogroup 内で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った。ORF を 3 個持つ NV 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が高まり、それは NV が宿主の免疫圧から生き延びるための手段であり、その結果大きな流行に繋がるとする可能性が考えられている。ちょうど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。

H22 年の重感染事例と考えられた検体、08v534_GII.3, が遺伝子組み換え株であったことは予期せぬ結果であった。幸いにもこのキメラウイルスによる地域での浸淫や NV 大流行の報告はない。しかし、2012/13 シーズンでは GII.4 のキメラウイルスが本邦のみならず世界的な流行となった。

今後、NV 流行拡大事例では、ウイルス側の要因の検索には、まずは NV 遺伝子変異を想定し、サーベイランス強化や molecular surveillance、新しい NV 変異株を、全塩基配列に限りなく近く精度よく検出することが重要である。

食中毒事例の食品から NV の検出は NV の関与を決定する基本的検査法である。

これまで、ノロウイルス食中毒事例では積極的疫学調査から疑い食材はある程度まで絞り込むことが可能であったが原

因食材の特定には至らない場合が殆どであった。また、収去すべき食材の保存が行われていない、というごく初歩的な問題点もあった。パンソルビン・トラップ法は食中毒事例-喫食食材との因果関係を特定する一つの優れた方法として、その評価は高い。本法以外にも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や牛血清アルブミン、ポリエチレングリコール 6000 及び NaCl を使用した水性二相分配法等が考案されており、今後の活用の期待が高まっている。いずれの方法においても、今後、感度を高めさらに特異性を高める改良が期待される。

E. 結論

疫学的調査でカキ喫食歴のない集団 NV 感染事例で検出された NV 重感染例から 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ウイルスであった。その後、キノラウイルスは 2012/13 シーズンで大流行の要因ウイルスと考えられた。迅速なキメラウイルスの検出は今後の感染・流行拡大防止の一つの対応策と考えられる。

食品中からのノロウイルス遺伝子検出法、パンソルビン・トラップ法は有効な検出方法である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Kazushi Motomura, Masaru Yokoyama, Hirotaka Ode, Hiromi Nakamura,