

平成 24 年度厚生労働科学研究費補助金(食品の安心・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」

総合研究分担報告(平成 22～24 年度)

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

研究分担者	片山 和彦	国立感染症研究所	ウイルス第 2 部
研究協力者	村上 耕介	国立感染症研究所	ウイルス第 2 部
研究協力者	朴 英斌	国立感染症研究所	ウイルス第 2 部
研究協力者	戸高 玲子	国立感染症研究所	ウイルス第 2 部

## 研究要旨

ヒトに感染するノロウイルスは、冬季ウイルス性胃腸炎の原因ウイルスとして、更に冬季に多発する集団食中毒の原因ウイルスとして知られている。食品から超高感度でノロウイルスを検出するには、ウイルスを抗血清で免疫沈降し、効率よく濃縮する必要がある。本研究では、免疫沈降に用いる抗ノロウイルス抗体、それを作製する抗原として、ウイルス様中空粒子を供給すること、さらに、ノロウイルス検出システムの開発と、それに用いる標準物質の開発を目的とした研究を行った。初年度、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。次年度、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。最終年度、次世代の世界標準となるノロウイルスの genotyping system が提唱されたため、それに対応可能、かつキメラウイルス解析に対応した標準プラスミド DNA の構築及び改良と、同時に検出システムの構築及び改良を行った。

### A. 研究目的

ノロウイルス(Norovirus; NoV)はヒト、ブタ、ウシ、マウスに感染する。ヒトノロウイルス(HuNoV)は、冬季ウイルス性胃腸炎、冬季に多発する非細菌性食中毒の原因ウイルスとして知られている。NoV は構造蛋白質(VP1)をコードする領域の塩基配列情報に基づき、5つの genogroup (GI, GII, GIII, GIV, GV)に分別されることが知られている。このうち、ヒトに感染するのは、GI、GII、GIVである。GIIIはウシ、GVはマウスに感染する NoV

である。NoV GI, GII は、更に複数の genotype クラスタに分別可能であり、2010 年現在、GIには genotype が 17 以上、GIIには genotype が 19 以上存在することが報告されている。食品からの NoV 検出は、食品にわずかに付着した NoV を効率よく食品から遊離させ、更に濃縮した後に NoV RNA を抽出し、RT-PCR を行わなければならない。HuNoV を選択的に沈降させ、濃縮するためには、特異的な抗体による免疫沈降が有効である。HuNoV には、前述のように複数の genotype が報告されており、こ

れらそれぞれの抗原性が異なるため、HuNoV を網羅的かつ選択的に沈降させるためには、すべての genotype に対する抗体を作出するか、すべての genotype と反応する抗体を入手する必要がある。我々は、全ての HuNoV genotype の約 70% に及ぶ特異抗体を作出してきた経験と過去の資産を生かし、残り 30% の新たな HuNoV に対する抗体の作出を開始した。

現在、ゴールデンスタンダードとして世界的に広く使用されている HuNoV の genotyping 法は、ORF2 の 5' 末端 300 塩基ほど（キャプシド N/S 領域）を用いる。この方法による genotyping は、HuNoV の抗原性を反映することができ、HuNoV の抗原性変化を予測できるため、分子疫学研究に広く用いられてきた。しかし、本方法は、ORF1 領域をカバーしておらず、HuNoV の genome recombination によって生じるキメラウイルスの解析はできない。キメラウイルスの検出には、少なくとも ORF1-ORF2 ジャンクション領域よりも 500~800nt 上流からキャプシド N/S 領域までの 1000nt 以上の遺伝子配列解析が必要になる。

平成 23 年度は、上記領域を含む全長約 1500nt をクローニングした新しいスタンダードプラスミドを作製するとともに、標的領域を増幅可能な GI, GII それぞれのユニバーサルプライマーをデザインし、新たな検出システム構築を試みた（これを第一世代プライマーセットとする）。しかし、HuNoV の約 80% の genotype を含む HuNoV 陽性糞便パネルを用いた検出率を検討した結果、その検出率は約 70~75% であった。また、第一世代プライマーセットの増幅産物は Capsid N/S region をカバーするが、ORF2 (VP1) 全長をカバーしていない。従って、

本方法で新規 genotype 候補が見つかった場合には、ORF2 の全塩基配列を決定するため、新たに ORF2 (VP1) 全長を増幅しなおす必要があった。平成 24 年度に我々は、Norovirus scientific committee によって刷新される新規 genotyping 法に対応し、かつ Capsid N/S region を用いた従来の genotyping、さらに ORF2 (VP1) 全長をカバー可能な増幅領域を持つ第二世代プライマーセット、RT-PCR 法を構築することを目的として研究を行った。

## B. 研究方法

### 1. 便検体

埼玉県衛生研究所より、譲渡され、国立感染症研究所ウイルス第二部第一室で保管管理されている NoV 陽性便検体パネルを用いた。本パネルは、譲渡後も国立感染症研究所にて新規 genotype 便検を補充し、現在報告されているほぼすべての genotype を含むパネルとして継続的に維持している。加えて、2012/13 シーズンに史上 2 番目の大流行を引き起こした GII/4 2012 変異株の便検体（新潟県・田村先生、北海道・吉澄先生、台湾 CDC の Wu 先生より提供を受けた）も用いた。

### 2. HuNoV の全塩基配列解析

全長塩基配列は、Long distance RT-PCR と primer walking 法によって行った。未知の genotype の完全長シーケンスには、次世代 sequencer（イルミナ MiSeq）を用いた。MiSeq によりドラフトシーケンスを作製後、それぞれの株特異的なプライマーをデザインし、Hi fidelity PCR enzyme prime STAR GXL (TAKARA) を用いて互いにオーバーラップする上流 4kb、下流 4kb の PCR フラグメ

ントを増幅した。それぞれの amplicon をドラフトシーケンスからデザインした primer によって direct sequence を行って決定した。

### 3. 構造タンパク質領域の全塩基配列の解析とウイルス様中空粒子作製、抗体作製

便検体 10% 乳剤より核酸を Viral RNA mini kit にて精製し、SK シリーズ F プライマーと Tx30SXN プライマーを用いて構造タンパク質領域約 2.6 Kb を RT-PCR で増幅した。増幅した DNA は、TOPO クローニングシステムとゲートウェイクローニングシステムを用いて、バキュロウイルストランスファクター pDEST8 に組み込み、DH10Bac 大腸菌にトランスフェクションして Bacmid を得た。Bacmid を Sf9 細胞にトランスフェクションして、recombinant Baculovirus (rBaculovirus) を作製し、プラーク純化した後、 $10^8$ /mL の力価のシードウイルスを作製して、ウイルス様中空粒子 (VLP) の作製に用いた。VLP は、Hi5 細胞を用いて作製した。作製した VLP を培養上性から分離精製し、ウサギに免疫して抗 VLP ウサギ血清を得、抗体として保存した。

### 4. 第一世代 primer デザインと RT-PCR

全長塩基配列のアライメントより、genome 5' 末端から約 4100 塩基付近の領域 (ORF1-2 ジャンクション領域から約 1 Kb 上流) に認められた高度保存領域にプライマーをデザインした。プライマーは、GI, GII それぞれにデザインした。GI プライマーを下に示した。

NVGIuni4223S20

5' -AARAATGAYGAYTGGAATGG-3'

NVGIuni4271S29

5' -CARGCDGCVCAYGCHAAAYARYATGTWTGA-3'

NVGIuni4274S26

5' -GCDGCNCAYGCHAAAYARYATGTWTGAG-3'

NVGIuni4442S23

5' -GGNCCVTTYTGTGABGCYATAAAA-3'

GII プライマーを以下に示した。

NVGIuni4229S23

5' -GTDGGNAWGAAYWRAATGARGA-3'

NVGIuni4292S20

5' - CAYTATGAYGCWGAYTAYTC-3'

NVGIuni4295S26

5' - TATGAYGCWGAYTAYTCNMGNTGGGA-3'

NVGIuni4769S19

5' - CGNGAYCCNGCDGGNTGGT-3'

### 5. 第二世代プライマーデザインと RT-PCR

全長塩基配列のアライメントより、genome 5' 末端から約 3000 nt に 1st step PCR 用 forward primer, 約 7400nt に reverse primer をデザインした。

<GI 1<sup>st</sup> step PCR 用プライマーセット>

UniKYFa GGBTGGGGHTTYTGGGT

UniKYFb GGWTGGGGHTTYTGGGT

GI-UniKYR GAHCCNGDGGNGTNAMCCA

<GII 1<sup>st</sup> step PCR 用 primer set>

UniKYFa GGBTGGGGHTTYTGGGT

UniKYFb GGWTGGGGHTTYTGGGT

GII-UniKYR GCDANRAADGCHCCWCCATTA

<GI nested PCR (2<sup>nd</sup> step PCR) 用 primer set

GI-UniKYFnest CCACNAARTCWGGYAACAC

GI-UniKYRnest CCNAWDAYRGCYTGRGCCATTAT

<GII nested PCR (2<sup>nd</sup> step PCR) 用 primer set>

GII- UniKYFnest GGNGNCARATGGGNATG

GII- UniKYRnest AADGCHCCWCCATTA

上記プライマーセットと Hi fidelity PCR enzyme prime STAR GXL との組み合わせにより、約 3.2-4 Kbps の long distance RT-PCR を実現する。本 RT-PCR により増幅される領域は、1<sup>st</sup> step RT-PCR amplicon, 2<sup>nd</sup> step amplicon 共に、完全長の polymerase region (RdRp) から Capsid N/S region をカバーし、ORF2 (VP1) 全長をカバーする。

## 6. 標準プラスミド

### a) 第一世代プラスミド

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、ORF1-ORF2 ジャンクション領域よりも 500~800nt 上流からキャプシド N/S 領域までの 1000-1400nt の遺伝子配列を含む必要がある。NV68 GI/1 プロトタイプ配列 (M87661 Norwalk virus, position 4265-5814)、Saga-1 GII/4 2006b 配列 (AB447456 saga1, position 4167-5621) にそれぞれ T7 RNA polymerase promoter を付加して合成し、pUC19 ベクターに組み込み pT7NV4265-5814, pT7Saga4167-5621 を作製した。これらを Stb12 大腸菌にトランスフェクションし、pT7NV4265-5814, pT7Saga4167-5621 を大量に精製して、OD 値より  $10^{10}$  copies/mL の用液を調整した。pT7NV4265-5814, pT7Saga4167-5621 の最終濃度はリアルタイム RT-PCR によって確認した。

### b) 第二世代プラスミド

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) のゲノム全長塩基配列に点突然変異を導入して、pUC ベクターに組み込んだ pNV68Fmut と、GII. 4 Saga1

(accretion number; AB447456) のゲノム全長塩基配列に点突然変異を導入して同様に pUC ベクターに組み込んだ pGII4Saga1mut を作製して用いた。これらのプラスミドは、リアルタイム RT-PCR の標準物質としても利用可能である。

### (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。組換え DNA 実験は全て国立感染症研究所の承認を得た上で実験計画に基づいて、認定施設内で実施した。

## C. 研究結果、考察

昆虫細胞発現系を用いて新たに HuNoV GI/13, GII/5, GII/7, GII/4 2006a, 2006b, 2008a の VLP 発現に成功した。これらの VLP を用いて抗 VLP ウサギ血清の作製に成功した。HuNoV の新たな遺伝子型は、現在もなお報告されつつあるが、本年度の追加により、我々の手元には、これまでの蓄積も含め約 80% の遺伝子型の VLP とそれに対応する抗体が存在する。主要流行株としては、2000 年以降 GII/4 が流行しており、抗原性の genetic drift が懸念されていたが、2006a, b, 2008a の発現と、抗血清によって genetic drift にも対応できると考えられた。これらの抗体を用いれば、現在流行している主要流行株はもちろん、それ以外の HuNoV も免疫沈降によって濃縮が可能となる。GII/4 2012 変異株の VLP は現在作製中であるが、2012 年変異株感染者便を用いた検討の結果、GII/4 に対するポリクローナル抗体、ブロードレンジモノクローナル抗体は、問題なく 2012 年変異株に反応した。我々は、残る 20% の VLP 作製と抗体の作製の

継続を優先しつつ GII/4 2012 変異株の VLP 並びに抗体作製も行っている。

コンベンショナルな RT-PCR, リアルタイム RT-PCR 用スタンダードプラスミドは、ORF1-2 ジャンクション下流約 300 塩基をカバーするプラスミドであった。それに対し、新たな標準プラスミドは、RdRp 領域から Capsid N/S 領域に至る約 1600 塩基をカバーし、HuNoV の遺伝子組み換えの起こるホットスポットである ORF1-2 ジャンクションを挟んだ領域を有する。本プラスミドコントロールを用いることで、リアルタイム RT-PCR はもちろん、分子疫学における HuNoV キメリズム解析にもスタンダードとして用いることが可能となった。本プラスミドより、T7 RNA polymerase を用いて *in vitro* 合成を行ったスタンダード RNA は、RT-PCR 反応における逆転写行程をモニターすることが可能であり、新たなスタンダードとして用いることができた。

新たな HuNoV 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初めて成功した。HuNoV の GI, GII, GIV をすべてアライメントした場合、プライマーをデザイン可能な塩基配列の高度保存領域を見いだせなかった。GI のみをアライメントすると、genome 5' 末端から約 1000 nt-1200 nt, 4100nt - 4500 nt, 5100 nt - 5400 nt に高度に塩基配列の細損された領域が存在することが明らかになった。GII の場合も、ほぼ同様の位置に高度に塩基配列の保存された領域が存在した。これらの領域は、それぞれ、N-terminal protein - NTPase ジャンクション領域, RNA dependent RNA polymerase (RdRp) の N-terminal 領域, ORF1-2 ジャンクション領域に対応していた。ORF1-2 ジャンクション領域を除く 2 つの領

域は、それぞれのタンパク質のアミノ酸配列が高度に保存され領域であるため、コドン 1, 2 の塩基配列保存性が高く、コドン 3 に多様性が認められた。RdRp に認められる特徴的な YGDD モチーフは、すべての RNA をゲノムに持つウイルスの RdRp に普遍的に存在することが知られている。しかし、驚いたことに、このモチーフよりも上流の領域に高度に塩基配列の保存された領域が発見された。

hNoV のゲノム組み替えを解析するためには、ゲノム組み替えのブレイクポイントである ORF1-2 ジャンクション領域の上流 1000 nt から Capsid N/S 領域 300 nt ほどの約 1000 nt - 1300 nt の塩基配列を決定し、ORF1 領域、Capsid N/S 領域それぞれに分子系統解析を実施するのが望ましい。そこで、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、SKR シリーズとの組み合わせで Semi-nested RT-PCR が実施可能であるように配置した。

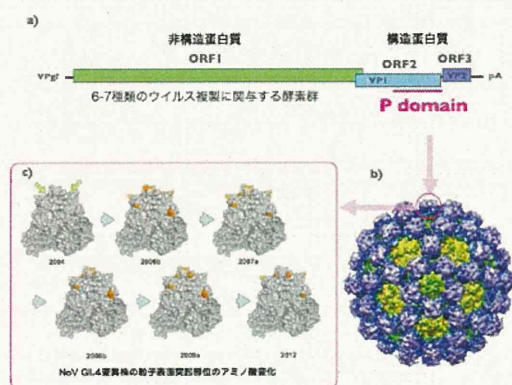
逆転写並びに PCR は、transcripter high fidelity RT (Roche), GXL DNA polymerase (TAKARA) を用いた検討の結果、SKR シリーズとの semi-nested RT-PCR により、GI では、約 1100 nt、GII では、約 1000 nt の増幅産物が得られることが明らかになった。

コントロールとして用いた GI, GII それぞれのコントロールプラスミド、さらにそれらから 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  $10^{\sim}100$  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ところが明らかになった。しかし、GII/4 2012 変異株の中には、本プライマーセットで検出できない株も含まれていた。

本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が、検出率の向上に関する改良が必要でだと思われた。

新規に全長塩基配列を決定した 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ており、相同性は 88% であった。ORF2 (VP1) 領域には、アミノ酸変異を伴う核酸変異が存在しており、図に示したように  $\alpha$ 1-2 フコース結合部位(緑色の矢印)の近傍に変異の集積が認められた。しかし、従来より広く用いられている genotyping 法や、コンベンショナルな RT-PCR, real-time PCR の primer probe のターゲット領域に変化はなかった。



第一世代プライマーセットの検出率向上が図れなかったため、GII/4 2012 変異株を加えた全長 genome 塩基配列のアライメントを再度施行した。6400nt 近傍、genome end 近傍に比較的良好に塩基配列の保存された領

域が存在することが明らかになった。さらに GI, GII に共通して TGGGTG のモチーフが 3000 付近に点在することを見いだした。GII の場合も、ほぼ同様の位置に高度に塩基配列の保存された領域が存在した。そこで、これらの情報に基づき TGGGTG モチーフを利用した第二世代プライマーセットをデザインした。

HuNoV genome 3' end に存在する poly A tail をターゲットとした Tx30SXN primer と SuperScript version III を用いた逆転写反応により合成した cDNA を用いて、第二世代プライマーセットを用いた RT-PCR, 1<sup>st</sup> step, 2<sup>nd</sup> step を行った。その結果、10<sup>5</sup>copies/g stool 以上の RNA titer があれば、テストした全ての遺伝子型で約 3.2kb の増幅産物が得られることが明らかになった。第二世代プライマーセットにより、第一世代に比べ、約 20% 程度の検出率向上が認められた。

第 2 世代プライマーセットは、2<sup>nd</sup> step PCR まで持ち込めば、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することが明らかになった。また、1<sup>st</sup> step PCR amplicon 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 amplicon を用いた従来の Capsid N/S 領域の genotyping, RdRp 領域を用いた genotyping, キメラウイルスの解析、genome 全長において最も多様性に富む VP1/P2 domain を用いた分子疫学にも対応できる。しかし、本研究結果は、代表的な genotype に対する試験結果であり、GI, GII の混合感染事例、レアな genotype に対する検討を行うとともに、実用試験を重ねる必要があると思われた。第二世代プライ

マーもまた、genogroup IV を対象としていない。従って、本研究で新たに構築した検出システムでは、依然として GIV は検出できない可能性が残っている。

#### D. 結論

本研究で、新たに 18 株の NoV 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 NoV genotype, GI.13, GI.10, GI.19, GII.5, GII.6, GII.11, GII.12, GII.14, GII new genotype 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 genotype クラスターの内、約 70%の全長配列が明らかにされた。本研究により、NoV 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 genotype を報告するために必要な完全長 ORF2(VP1)領域までの塩基配列のアライメントが可能となった。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。

#### F. 研究発表

##### 論文発表

- (1) Oka T, Takagi H, Tohya Y, Murakami K, Takeda N, Wakita T, Katayama K. Bioluminescence technologies to detect calicivirus protease activity in cell-free system and in infected cells. *Antiviral Research*. [Epub ahead of print]
- (2) Sharp, T. M., Guix, S., Katayama K., Crawford, S. E., Estes, M. K. Inhibition of Cellular Protein Secretion by Norwalk Virus Nonstructural Protein p22 Requires a Mimic of an Endoplasmic Reticulum Export Signal. *PLoS ONE* 5(10) e13130, 2010.
- (3) Oka T, Murakami K, Wakita T, Katayama K. Comparative site-directed mutagenesis in the catalytic amino acid triad in calicivirus proteases *Microbiol Immunol*. 2011.Feb; 55 (2): 108-114.
- (4) Kitajima M, Oka T, Haramoto E, Phanuwat C, Takeda N, Katayama K, Katayama H. Genetic Diversity of Genogroup IV Noroviruses in Wastewater in Japan. *Lett Appl Microbiol*. 2011 Feb; 52 (2): 181-184.
- (5) Kitajima M, Oka T, Takagi H, Tohya Y, Katayama H, Takeda N, Katayama K. Development and application of a broadly reactive real-time reverse transcription-PCR assay for detection of murine noroviruses. *J. Virol. Methods*. 2010 Nov;169(2):269-73.
- (6) Kitajima M, Oka T, Haramoto E, Takeda N, Katayama K, Katayama H. Seasonal distribution and genetic diversity of genogroups I, II, and IV noroviruses in the Tamagawa River, Japan.



- Environ Sci Technol. 2010 Sep 15;44(18):7116-22.
- (7) Ueki Y, Shoji M, Okimura Y, Miyota Y, Masago Y, Oka T, Katayama K, Takeda N, Noda M, Miura T, Sano D, Omura T. Detection of Sapovirus in oysters. Microbiol Immunol. 2010 Aug;54(8):483-6.
- (8) Motomura K, Yokoyama M, Ode H, Nakamura H, Mori H, Kanda T, Oka T, Katayama K, Noda M, Tanaka T, Takeda N, Sato H; Norovirus Surveillance Group of Japan. Divergent evolution of norovirus GII/4 by genome recombination from May 2006 to February 2009 in Japan. J. Virol. 2010 Aug;84(16):8085-97.
- (9) Iizuka S., Oka T., Tabara K., Omura T., Katayama K., Takeda N., Noda M. Detection of sapoviruses and noroviruses in an outbreak of gastroenteritis linked genetically to shellfish J. Med. Virol. 2010 Jul;82(7):1247-54.
- (10) Kitajima M., Oka T., Haramoto E., Katayama H., Takeda N., Katayama K., Ohgaki S. Detection and Genetic Analysis of Human Sapoviruses in River Water in Japan Appl Environ Microbiol. 2010 Apr;76(8):2461-7
- (11) Yamashita Y, Ootsuka Y, Kondo R, Oseto M, Doi M, Miyamoto T, Ueda T, Kondo H, Tanaka T, Wakita T, Katayama K, Takeda N, Oka T. Molecular Characterization of Sapovirus Detected in a Gastroenteritis Outbreak at a Wedding Hall. J. Med. Virol. 2010 Apr;82(4):720-6.
- (12) 岡智一郎, 片山和彦、小林慎一、飯高順子、野田衛 “愛知県と川崎市の食中毒事例から検出されたサポウイルス GI/2 の塩基配列の比較 “ 病原体微生物情報 (IASR) Vol. 31 No. 11 (No. 369), 2010 年 11 月号 p13-p14
- 学会発表
- (1) Harada S, Nishimura K, Kiyota N, Matsumoto K, Yahiro S, Okada M, Katayama K, Oka T. Surveillance of pathogens in outpatients with gastroenteritis and genetic analysis of sapovirus strains between 2002 and 2009 in Kumamoto Prefecture, Japan 16<sup>th</sup> Federation of Asian Veterinary Associations Congress 2011 February 16-18, 2011. Cebu City, Philippines
- (2) 岡智一郎、横山勝、高木弘隆、本村和嗣、村上耕介、佐藤裕徳、脇田隆字、片山和彦。カリシウイルスプロテアーゼ catalytic triad 形成残基のポリプロテイン切断活性への重要性。第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会。2010 年 12 月 7~10 日、神戸



- (3) 村上耕介、岡智一郎、脇田隆字、松田幹、片山和彦。ノロウイルスのヒト腸管由来培養細胞への結合様式。第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会。2010年12月7～10日、神戸
- (4) 野田衛、片山和彦、石井孝司、岡智一郎、多田有希、山下和予、三瀬敬治、地方衛生研究所、中村奈緒美、島田智恵、岡部信彦。「塩基配列情報共有化の食品媒介ウイルス感染症の疫学調査への応用」第31回日本食品微生物学会総会、2010年11月11日～12日、滋賀
- (5) 斎藤博之、東方美保、岡智一郎、片山和彦、田中智之、野田衛。食品検体のノロウイルス検査を目的としたパンソルビン・トラップ法の開発。第31回日本食品微生物学会総会、2010年11月11日～12日、滋賀
- (6) 北元憲利、岡智一郎、片山和彦、Hansman GS、三好龍也、田中智之。サポウイルスに対する単クローン抗体の解析。第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月7日～9日、徳島
- (7) 野田衛、入谷展弘、中田恵子、斎藤博之、田中忍、西川篤、北堀吉映、三谷亜里子、三瀬敬治、山下和予、岡智一郎、片山和彦、岡部信彦。関西で同時多発的に発生したノロウイルス食中毒事例の解析。第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月7日～9日、徳島
- (8) 高木弘隆、北島正章、遠矢幸伸、岡智一郎、片山浩之、片山和彦、杉山和良。マウスノロウイルス(MNV)のマウス由来培養細胞での増殖性についての検討。第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月7日～9日、徳島
- (9) 原田誠也、西村浩一、岡智一郎、片山和彦。「熊本県における感染性胃腸炎の起因病原体調査とサポウイルス genogroup の年次変化」。第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月7日～9日、徳島
- (10) 斎藤博之、東方美保、岡智一郎、片山和彦、田中智之、野田衛。食品検体のノロウイルス検査のためのパンソルビン・トラップ法の開発と拡大適用。第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月7日～9日、徳島
- (11) 村上耕介、岡智一郎、脇田隆字、松田幹、片山和彦。ノロウイルスのヒト腸管由来細胞への結合様式の解析。第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月7日～9日、徳島
- (12) 北島正章、岡智一郎、原本英司、武田直和、片山和彦、片山浩之。国内の下水および河川水からのGenogroupIVノロウイルスの検出および遺伝子解析。第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月7日～9日、徳島
- (13) 岡智一郎、高木弘隆、遠矢幸伸、村上耕介、脇田隆字、片山和彦。ネコカリシウ

- イルスの新規リバーシジェネティクス系の構築. 第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月7日～9日、徳島
- (14) 浅野有香、村上耕介、鈴木さやか、灘野大太、宇理須厚雄、岡智一郎、片山和彦、松田幹「母乳に含まれるヒトノロウイルス感染抑制因子の探索」日本農芸化学会中部支部第159回例会 2010年10月30日 名古屋
- (15) Kitajima M, Oka T, Haramoto E, Takeda N, Katayama K, Katayama H. Genetic diversity of human noroviruses and sapoviruses in river water, Japan. Fourth International Conference on Caliciviruses. October 16-19, 2010, Santa Cruz, Chile
- (16) Yokoyama M, Oka T, Katayama K, Kanda T, Sato H. Structural Insight into Substrate Recognition based on P4 and P1 residues by Sapovirus 3C-like Protease. Fourth International Conference on Caliciviruses. October 16-19, 2010, Santa Cruz, Chile
- (17) Motomura K, Yokoyama M, Ode H, Oka T, Katayama K, Noda M, Tanaka T, Sato H, and Norovirus Surveillance Group of Japan. Evolution of Norovirus GII/4 in Japan by Genome Recombination. Fourth International Conference on Caliciviruses. October 16-19, 2010, Santa Cruz, Chile
- (18) Murakami K, Oka T, Wakita T, Matsuda T, Katayama K. Analysis of Mechanism of Human Norovirus Binding to Caco-2 Cells. Fourth International Conference on Caliciviruses. October 16-19, 2010, Santa Cruz, Chile
- (19) Oka T, Yokoyama M, Takagi H, Tohya Y, Motomura K, Murakami K, Wakita T, Sato H, Katayama K. Antiviral Development Fourth International Conference on Caliciviruses. State-of-the Art October 16-19, 2010, Santa Cruz, Chile.
- (20) Hnasman, G.S. Chen, L. Georgeiv, I. McLellan, J.S. Katayama, K. Kwong, P.D. Crystal Structures of a rare Norovirus P-Domain in Complex with Histo-Blood Group Antigens. 4th International Conference on Calicivieruses. Santa Cruz, Chile, Oct 16-19, 2010.
- (21) Sharp, T.M., GUIX, S., Katayama, K., Crawford, S.E., Estes, M.K. Inhibition of Cellular Protein Secretion by Norwalk Virus Nonstructural Protein P22 requires a Mimic of an Endoplasmic Reticulum Export Signal. 4th International Conference on Calicivieruses. Santa Cruz, Chile, Oct 16-19, 2010.

#### 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

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」  
総合研究分担報告(平成 22～24 年度)

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

研究分担者	村上 耕介	国立感染症研究所	ウイルス第二部
研究協力者	岡 智一郎	国立感染症研究所	ウイルス第二部
	李 天成	国立感染症研究所	ウイルス第二部
	片岡 紀代	国立感染症研究所	感染病理部
	北元 憲利	兵庫県立大学	
	田中 智之	堺市衛生研究所	
	吉澄 志磨	北海道立衛生研究所	
	石田 勢津子	北海道立衛生研究所	
	原田 誠也	熊本県保健環境科学研究所	
	入谷 展弘	大阪市立環境科学研究所	
	飯塚 節子	島根県保健環境科学研究所	
	岩切 章	宮崎県衛生環境研究所	
	片山 和彦	国立感染症研究所	ウイルス第二部

研究要旨

サポウイルスはノロウイルスと同様、急性胃腸炎を引き起こす。近年、サポウイルスによる大規模な集団食中毒事例が報告されており、ノロウイルスと同等の検出体制の整備が求められる。サポウイルスの検出には主に核酸検出系が用いられており、精度、感度の改良が進められている。一方で、抗原抗体反応を用いた検出系の開発は遅れており、臨床検体からの迅速抗原検出系や、食品中のウイルス濃縮法の開発が重要課題となっている。本研究で我々は、サポウイルス特異抗体の作製とサポウイルスの抗原性評価に必要となる、サポウイルス様中空粒子 (virus-like particles: VLPs) の作製に取り組んだ。本研究において合計 21 株のサポウイルス VLPs の発現に成功し、全ての genotype の約 7 割をカバーすることができた。

A. 研究目的

サポウイルスは小型球形のノンエンベロープウイルスで、ノロウイルスと同様、乳幼児から高齢者まで年齢を問わず急性

胃腸炎を引き起こす。核酸検出系を用いた検討から、サポウイルスの核酸排泄量は  $10^{6-11}$  copies/g stool と推測される。また、その排出期間は、通常で症状回復

後 1-2 週間、最大で 1 か月程度続くとされることから、ノロウイルスと同様の特徴を示す。

サポウイルスのゲノムはプラス 1 本鎖 RNA で、構造タンパク質コード領域全長塩基配列の違いから、少なくとも 5 つの遺伝子群 (genogroup: GI, GII, GIII, GIV, GV) に分類される。さらに GI, GII は、それぞれ 7 つの遺伝子型 (genotype: GI.1-7, GII.1-7) に分類される [Oka et al, Arch Virol (2012) 157:349-352]。なお、ヒトからは GI, GII, GIV, GV が検出されている。

サポウイルスのウイルス粒子は、1 種類の構造タンパク質の 180 量体であると考えられている。この構造タンパク質コード領域を昆虫細胞などで発現させると、ウイルスゲノムを持たないウイルス様中空粒子 (virus-like particles: VLPs) を作出することができる。この VLPs は患者糞便から検出されるサポウイルスと同じ形態を示し、ネイティブウイルスと同一の抗原性を示すと考えられている。サポウイルスの抗原性は VLPs を用いて調べられており、ノロウイルスと同様、genogroup が異なると抗原性も異なることが示された [Hansman et al, Emerg Infect Dis (2007) 13(10):1519-1525]。また、同じ genogroup でも、genotype が異なると抗原性が異なる [Hansman et al, J Clin Microbiol (2007) 45(4):1347-1349; Oka et al, Microbiol Immunol (2009) 53(7):417-420]。

サポウイルスの検出は主に reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) 法、リアルタイム

RT-PCR 法などの遺伝子増幅法が用いられる。遺伝子増幅法は改良が重ねられており、高精度、高感度なサポウイルス検出が可能となっている。その結果、サポウイルスが検出される急性胃腸炎事例が増加しており、サポウイルス急性胃腸炎事例は、従来の予想よりも高頻度に起きていると考えられるようになってきた。なお、サポウイルスの主な感染ルートはヒト-ヒト感染と考えられているが、サポウイルス汚染食材が原因とされる大規模食中毒事例も報告されている。そのためノロウイルス同様、食品からも検出可能な手法の開発が求められている。前述のように、サポウイルスの検出には遺伝子増幅法が多く用いられる。しかし、遺伝子増幅法は結果が得られるまでに時間を要する。そのため、迅速かつ安価な抗原検出系の開発が重要な課題となってきている。

本研究班の北元憲利 兵庫県立大学教授、田中智之 堺市衛生研究所所長らによって、サポウイルス GI.1 Mc114 株、GI.5 Yokotel 株、GII.3 Syd53 株、GIV Syd3 株、GV NK24 株 VLP を免疫抗原としたモノクローナル抗体が複数得られた。このモノクローナル抗体は、抗原検出系を検討する上で有用なツールとなる可能性を持つ。しかし、サポウイルスには多様な genotype が存在することから、このモノクローナル抗体の反応性を評価する必要がある。そこで本研究では、各 genotype の株に対応する VLPs を作出し、抗原反応性の評価に必要となるサポウイルス VLPs パネルを作成することを目的とした。

## B. 研究方法

## 1. 材料

6 つの衛生研究所との共同研究によって国内の急性胃腸炎事例から検出されたサポウイルスのうち、GI. 2、GI. 3、GI. 7、GII. 3、GII. 4、GII. 7、GIV に属する株を選択した。

## 2. サポウイルス VLPs 発現コンストラクトの作製

サポウイルス GI. 3 OH08021 株 [AB623037]、GI. 6 Nichinan 株 [AB455803]、GI. 7 D1714 株 [AB522390]、GII. 3 D1711 株 [AB522391]、GII. 3 AB630068 株 [AB630068]、GII. 3 Kushiro 株 [AB455793]、GII. 3 Nayoro 株 [AB455794]、GII. 4 Kumamoto6 株 [AB429084]、GII. 7 20072248 株 [AB630067]、GIV Yakumo 株 [AB455795] の構造タンパク質コード遺伝子の開始コドンからゲノム末端までの cDNA 領域に対応する約 2.3 kb を Infusion Cloning kit (Clontech) を用いて、バキュロウイルストランスファーベクター pVL1392 (Orbigen) のマルチクローニングサイト (Not I/Bam HI 間) にクローニングした。精製したプラスミドのシーケンスによって、得られたクローンがデータベース登録配列と一致することを確認した。

## 3. サポウイルス VLPs 発現用組換えバキュロウイルスの作製

8% FCS 添加 Grace medium を用いて培養した Sf9 細胞を 6 ウェルプレートに移し、培地を ExCell-405 (2 mL/ウェル) に置換した後、Lipofectin Reagent (Invitrogen) を用いて上記プラスミド (1-2  $\mu$ g) と BaculoGold (BD Bioscience) (0.5  $\mu$ g) を co-transfect した。一晚培養

後、各ウェルに 8% FCS 添加 Grace medium 2 mL を加え、合計 4 mL/ウェルとし、さらに 7 日間培養した。

この培養上清を別途 8% FCS 添加 Grace medium を用いて T75 フラスコ 3 枚に培養した Sf9 細胞に添加し、さらに 7 日間培養した。この培養上清 (約 35 mL) を VLPs 発現用組換えバキュロウイルスのシード (種) とした。調製したシードウイルス液は遮光し、4°C で保存した。

## 4. 昆虫細胞を用いたサポウイルス VLPs の発現

シードウイルス液を、T75 フラスコ 30 本に培養した Tn5 細胞に 1 mL ずつ添加し、7 日後に培養上清 (約 300 mL) を回収した。回収した培養上清を 4°C で 10,000 xg、60 分間遠心し、細胞破砕物およびバキュロウイルスを沈殿させた。その後、遠心上清を Sw32Ti ローター (Beckman Coulter) により、4°C で 32,000 rpm、3 時間、超遠心を行った。上清を除去後、遠心チューブにそれぞれ 300  $\mu$ L の ExpressFive SFM を加え、4°C で 1 晩静置した。その後、この溶液 (合計約 2 mL) を 4°C で 10,000 xg、30 分間遠心し沈殿残渣を除去し、上清を SW55Ti ローター (Beckman Coulter) により 4°C で 50,000 rpm、2 時間、超遠心を行った。上清を除去後、遠心チューブに各 100  $\mu$ L (合計約 200  $\mu$ L) の ExpressFive SFM を加え、4°C で一晚静置溶解後、4°C で 10,000 xg、5 分間遠心し沈殿残渣を除去した。MilliQ 水に 1.8 g の塩化セシウムを溶解し、VLPs 溶液を全量加え、合計約 5 mL とした後、Sw55Ti ローターを用いて 10°C で 35,000rpm、24 時間超遠心を行った。超遠心後、遠心チューブをライトで

照らして観察されるバンドを 23G 注射針で抜き出した。抜き出した溶液を ExpressFive SFM で 5 倍以上に希釈し、SW55Ti ローターを用いて 4°C で 50,000 rpm、2 時間、超遠心を行った。上清を除去後、各遠心チューブに ExpressFive SFM を 100-200  $\mu$ l 加え、4°C で一晩静置した。得られた溶液を電子顕微鏡で観察することで VLPs を確認した。また SDS-PAGE/CBB 染色を行うことで濃度を調べた。

(倫理面への配慮)

本研究では、特定の研究対象者が存在せず、倫理面への配慮は不要である。組換え DNA 実験は全て国立感染症研究所の承認を得た上で実験計画に基づいて、認定施設内で実施した。

### C. 研究結果

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。この組換えバキュロウイルスを用いて VLPs 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、これらの VLPs はサポウイルスに特徴的な形態を有していた。

VLPs の収量は GI. 3 OH08021 株が 18  $\mu$ g、GI. 6 Nichinan 株が 75  $\mu$ g、GI. 7 D1714 株が 4  $\mu$ g、GII. 3 D1711 株が 3  $\mu$ g、GII. 3 AB630068 株が 3  $\mu$ g、GII. 3 Kushiro 株が 20  $\mu$ g、GII. 3 Nayoro 株が 15  $\mu$ g、GII. 4 Kumamoto6 株が 15  $\mu$ g、GII. 7 20072248 株が 260  $\mu$ g、GIV Yakumo 株が 30  $\mu$ g であった。

### D. 考察

サポウイルスは、ノロウイルスと比較

して VLPs の収量が少なくとも 1/10 程度低い。本研究では、Tn5 の培養に Ex-Cell 405 (Invitrogen) および ExpressFive SFM (Invitrogen) を使用した。しかし、いずれの培地でも VLPs の発現量に大きく差が認められなかった。一方で、株ごとの発現量に大きな差が見られたことからサポウイルス VLPs の発現量は株に依存することが示唆された。

本研究班で得られた結果から、北元憲利教授らが作製したモノクローナル抗体が、本研究で得られた VLPs (GI. 3, GI. 7 を除く) に対して反応性を持つことが示された。このことは、各 genogroup、genotype に対応する特異抗体を作製せずとも、高精度のサポウイルス抗原検出系を構築できる可能性を支持している。なお GI. 3 OH08021 および GI. 7 D1714 は、反応性評価を未実施であることから、この genotype に対してもモノクローナル抗体が有効であるかどうかを評価する必要がある。

本研究では、これまでに得られていた 7 つの genotype の他に、新たに 4 つの genotype に属する VLPs を作出した。この結果、これまでに報告されている 16 つの genotype の約 70% をカバーする VLPs パネルが得られた。しかし、カバーできていない genotype があることから、今後も VLPs パネルの完成を目指す。このことにより、サポウイルス抗原の迅速検出系、および、食品からのサポウイルス濃縮法の開発に役立てることが期待された。

### E. 結論

本研究により、合計 10 株の VLPs を作



出することに成功した。この結果、合計16の genotype のうち、約7割をカバーするサポウイルスVLPsパネルを作成することができた。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が促進される可能性が期待された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Oka T, Mori K, Iritani N, Harada S, Ueki Y, Iizuka S, Mise K, Murakami K, Wakita T, Katayama K.

Human sapovirus classification based on complete capsid nucleotide sequences.

Archives of Virology., 2011;157(2):349-52

### 2. 学会発表

1) Oka T, Hansman GS, Murakami K, Todaka R, Wakita T, Katayama K, sapovirus study group of Japan.

Human sapovirus classification scheme based on pairwise distance analysis of complete capsid nucleotide sequences.

IUMS 2011、2011年9月、札幌

## 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

厚生労働科学研究費補助金(食品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

日本における 2010～2012 年の A 型肝炎の分子疫学的解析

研究分担者 石井孝司 (国立感染症研究所ウイルス第二部・室長)  
共同研究者 野田 衛 (国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部・室長)

**研究要旨:** 日本での A 型肝炎患者数は 2007 年以降非常に低いレベル (150 人/年程度) で推移していたが、2010 年は 3 月から全国各地で A 型肝炎が多発し、最終的には年間 342 人の患者発生を見た。また、2011 年には千葉市で大規模な A 型肝炎の食中毒事例があった。本研究では全国の地方衛生研究所と共同で、2010 年から 2012 年まで、A 型肝炎患者の糞便または血清から A 型肝炎ウイルス (HAV) ゲノムの配列を決定し、近年の日本における流行状況を分子疫学的に解析した。

A. 研究目的

日本での A 型肝炎患者数は 2007 年以降非常に低いレベル (150 人/年程度) で推移していたが、2010 年は 3 月から全国各地で A 型肝炎が多発し、2010 年の A 型肝炎患者数は最終的には 342 人に達した。我々は、感染症情報センター、国立医薬品食品衛生研究所、および全国の地方衛生研究所と共同で、A 型肝炎の全国的なサーベイランスシステムを構築し、ウイルス (HAV) ゲノムの塩基配列情報を基に分子疫学的な解析を行っている。本研究では、2010 年から 2012 年の A 型肝炎の日本における発生状況について分子疫学的解析を行い、流行状況の調査を行った。

B. 研究方法

A 型肝炎患者の便乳剤または血清から RNA を抽出し、平成 21 年 12 月 1 日に医薬食品局食品安全部監視安全課長より通知された食安監発 1201 第 1 号「A 型肝炎ウイルスの検出法について」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た。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な解析を行なった。倫理面への配慮: 取り扱うすべての DNA および病原性微生物に関しては適切な封じ込めレベルの実験施設で取り扱われる。各種研究材料の取り扱い及び組換え DNA 実験は、適切な申請を行い承認を受ける。

C. 研究結果

2010 年は合計 59 株について配列解析を行なった。その結果、genotype 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ることが判明した (図 1、表 1)。IA のクラスターの 1 つ (IA-1、オレンジで示した部分) は 2006 年に日本で滋賀、新潟などで小流行した株と類似しており、また同じクラスターに属する株が 2001

年から継続して検出されていることから、少なくとも 10 年程度前から日本に常在していた株と推定される。一方、IA のもう 1 つのクラスターに属する株 (IA-2、赤で示した部分) は解析を行なった株の過半数を占め、非常に均一性が高く、しかも 2007 年にドイツで確認された株 (HAV-DE-2007/08-196、IA-2 中に紫で示した株。ここでは GM2007 と呼ぶ) と同一の配列であった。GM2007 は 2007 年にフィリピンへ旅行し帰国直後に急性肝炎を発症した 11 歳の女兒から得られた株である。また、このクラスターに属する日本の患者の中には、フィリピンからの帰国直後に発症した事例が 2 例あった。本クラスターはフィリピンとの関連が示唆されることから、データベースよりフィリピンの河川水、下水由来の HAV 配列を取得して系統樹解析を行なった結果、これらの配列の一部は本クラスターに属していることが判明した。以上の結果から、本クラスターに属する IA 株は、フィリピンの HAV と関連があることが強く示唆された。

日本において、従来 Genotype IIIA に属する HAV の報告は非常に少なかったが、2010 年は 30% 近くが IIIA に分類されている。韓国においては、2000 年以降の HAV の主要な genotype は IA であったが、2008 年から急性 A 型肝炎の大流行が発生しており、2009 年には患者数は 15231 人、2010 年の 32 週までの患者数は 4766 人に達している。この大流行の際にドミナントな genotype が IA から IIIA に移行していることが報告された。2010 年に日本で検出された IIIA の株 (IIIA、青で示した部分) は、この韓国で大流行した IIIA 株と同じクラスターに属しており、韓国での流行との関連が示唆された。

Genotype IB が検出された患者 (図に緑で記載) は、エジプト、トルコなど中近東地域への旅行から帰国直後に発症しており、旅行先での感染が示唆される。トルコ産のセミドライトマトが原因と見られる genotype IB の A 型肝炎の流行が、フランス、オランダ、オーストラリアなどで発生して

おり、中近東地域で主流と見られる HAV と本事例の遺伝子型が一致していることも旅行先での感染を示唆する。

2011 年は合計 52 株について配列解析を行なった。その結果、genotype 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。2011 年の流行の原因の 1 つであった IA-2 のクラスターに属する株は 1 株（他に類似株が 2 例）のみであり、これらのクラスターに属さない IA 株として、パプアニューギニアおよびブラジルでの感染と考えられる株がそれぞれ 1 株ずつ検出された。IIIA は 2011 年も 5 株検出された。

千葉市での集団食中毒事例は、最終的には確定診断で患者数 49 名という大きな流行となった。本事例については千葉市環境保健研究所が中心となって詳細な解析を行った。その結果、患者 20 名は 1 月 8 日～1 月 21 日にかけて全身倦怠感、発熱、黄疸等の肝炎症状を呈していることが明らかとなった。（図 2）また、これらの患者の 2010 年 11 月下旬～12 月中旬における喫食状況等の調査を実施したところ、患者は市内寿司店で調理、提供された食事を喫食していたことが明らかとなった。

（図 3）分子疫学的解析については、解析可能であった検体はすべて国内に常在していると考えられる IA-1 のクラスターに属し、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ることが明らかとなった。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。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。

2012 年は現在までに 28 株の解析を行った。IA が 21 株、IB が 2 株、IIIA が 4 株、IIIB が 1 株であった。野田市で発生した家族内感染では 6 人が発症している。日本に常在する IA 株（IA-1）によると考えられる。

2010 年に diffuse outbreak の主な原因となった東南アジア由来と考えられる株（IA-2）は、2011 年には静岡県で 1 例報告されたのみ（他に類似配列が佐賀県で 2 例報告されている）で、2012 年上期には見つかっていないことから、日本に定着せずにはほぼ消失したものと考えられる。

#### D. 考察

2010 年の遺伝子型の推移を図 4 に示した。IA-2 に分類される検体は、3 月後半から 5 月前半をピークとして 5 月後半まで検出され、それ以降は検出されていない。配列の均一性が高いこととあわせ、このクラスターに属する株は同一の感染源から何らかの理由で全国に拡散して広域流行をおこし、二次的な拡大はせずに収束したものと推定される。また、3A は 4 月後半から検出されはじめ、5 月前半をピークとしてゆるやかに発生数を減少させていた。本株は前述のように韓国との関連が

深いと考えられ、韓国から継続して流入し日本に常在する可能性に注意を払う必要がある。

千葉市における集団事例では、原因となった寿司店を特定することができ、また、A 型肝炎に罹患した調理従事者により直接、または調理施設等を介して間接に汚染したためであることを明らかにできた。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点、分子疫学的解析の情報共有ができた点が大きく、そのために潜伏期間が長く、従来は感染源の特定が困難な A 型肝炎の感染経路の特定ができたものと考えられる。現在の日本では 60 歳以下の人口のほとんどが HAV に対する抗体を持たず、HAV が何らかの理由で流入した場合に大きな流行となる危険性が従来より指摘されているが、今回の例はこの危険が現実になったものと考えられる。生鮮魚介類を扱う生産者や調理従事者への A 型肝炎ワクチン接種が強く推奨される。

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、2011 年には類似株を含めても 3 株のみであり、2012 年には全く検出されなかった。このクラスターに属する株は同一の感染源から何らかの理由で 2010 年に全国に拡散して広域流行をおこしたが、二次的な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。

Genotype IIIA に属する株は 2010 年に引き続き 2011 年も検出されており、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。IIIB は 2011 年に宮城県で 1 株、2012 年に北海道で 1 株が検出された。また、中近東地域への旅行者から 2010 年と 2012 年に検出された株は、いずれも当該地域の主要な genotype である IB であった。

#### E. 結論

2010 年に A 型肝炎が多発した理由は、従来日本に常在していた株に加え、GM2007 と同一配列である株（IA-2）が新たに日本で流行し、また韓国で大流行した株も一部日本に侵淫してきたためであると考えられた。IA-2 は 2011 年以降にはほとんど見られず、日本には定着せずに消失した可能性が示唆されるが、引き続き注意を払う必要がある。IIIA は 2011 年、2012 年も検出されており、日本への定着が懸念される。

今回の研究により、日本での A 型肝炎の流行状況についてかなり詳細に解析することができた。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、今後もこのようなサーベイランスシステムを継続していくことは極めて重要であると考えられる。

全国サーベイランス共同研究者

清原知子、吉崎佐矢香、佐藤知子、島田智恵、中村奈緒美、中島一敏、多田有希（国立感染症研究所）

上間 匡 (国立医薬品食品衛生研究所)  
 筒井理華 (青森県) 青木洋子 (山形県) 関根雅夫  
 (仙台市) 齊藤哲也 (新潟市) 原 孝 (茨城県)  
 山崎彰美 (柏市) 篠原美千代 (埼玉県) 新開敬行  
 (東京都) 涌井 拓 (千葉県) 清水英明 (川崎市)  
 宇宿秀三 (横浜市) 大沼正行 (山梨県) 長岡宏美  
 (静岡県) 吉田徹也 (長野県) 岡村雄一郎 (長野  
 市) 小原真弓 (富山県) 柴田伸一郎 (名古屋市)  
 楠原 一 (三重県) 近野真由美 (京都市) 入谷展  
 弘 (大阪市) 飯島義雄 (神戸市) 川西伸也 (姫路  
 市) 榎原啓子 (岡山市) 榎本義正 (福山市) 岡本  
 玲子 (山口県) 世良暢之 (福岡県) 川本大輔 (福  
 岡市) 増本久人 (佐賀県) 上村晃秀 (鹿児島県)

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Yang L., Kiyohara T., Kanda T., Imazeki F., Fujiwara K., Gauss-Muller V., Ishii K., Wakita T., Yokosuka O. Inhibitory effects on HAV IRES-mediated translation and replication by a combination of amantadine and interferon-alpha. *Virology Journal*, 7: 212 (2010)
  2. 清原知子、石井孝司 新時代のワクチン戦略について考える A型肝炎 臨床検査 54: 1383-1391 (2010)
  3. Yoshida T., Miyasaka T., Azegami Y., Uchiyama Y., Kasahara H., Ueda H., Nagase H., Fujita S., Ishii K. and Noda M. Investigation of epidemiology and HAV genomes regarding three hepatitis A infections that occurred in April-May, 2010-Nagano. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 64: 260-261 (2011)
  4. Li T.C., Song S. Yang Q., Ishii K., Takeda N., and Wakita T. A cell culture system for hepatitis E virus. *Hepatology International*. 5: 202 (2011)
  5. Ishii K., Kiyohara T., Yoshizaki S., Shimada T., Nakamura N., Tada Y., Noda M. and Wakita T. Epidemiological and genetic analysis of a diffuse outbreak of hepatitis A in Japan, 2010. *Hepatology International*. 5: 204-205 (2011)
  6. 石井孝司、清原知子 A型肝炎の血清保有状況と最近の流行状況 小児科 52: 1819-1825 (2011)
  7. 道免和文、小野原伸也、田中博文、春野政虎、下田慎治、姜 貞憲、石井孝司、高橋和明 2010年A型肝炎ウイルス福岡株に対する分子疫学的検討-1999年ボルネオ(カリマンタン)島由来株との近縁性 肝臓 52: 497-502 (2011)
  8. 石井孝司 A型肝炎ウイルスのウイルス学的特徴 日本臨床 69:559-565 (2011)
  9. 石井孝司、李 天成 E型肝炎 公衆衛生 75: 43-46 (2011)
  10. Kanda T., Wu S., Kiyohara T., Nakamoto S., Jiang X., Miyamura T., Imazeki F., Ishii K., Wakita T. and Yokosuka O. Interleukin 29 suppresses hepatitis A and C viral internal ribosomal entry site-mediated translation. *Viral Immunology*, 25: 379-386 (2012)
  11. Kubota T., Kumagai A., Ito H., Furukawa S., Ishii K., Wakita T., Takeda N., Someya Y., Narimatsu H. and Shirato H. Structural basis for the recognition of Lewin antigens by genogroup I norovirus. *Journal of Virology*, 86: 11138-11150 (2012)
  12. Tominaga A., Kanda T., Akiie T., Komoda H., Ito K., Abe A., Aruga A., Kaneda S., Saito M., Kiyohara T., Wakita T., Ishii K., Yokosuka O. and Sugiura N. Hepatitis A outbreak associated with a revolving sushi bar in Chiba, Japan: application of molecular epidemiology. *Hepatology Research*, 42: 828-834 (2012)
  13. Miyamura T., Ishii K., Kanda T., Tawada A., Sekimoto T., Wu S., Nakamoto S., Arai M., Fujiwara K., Imazeki F., Kiyohara T., Wakita T. and Yokosuka O. Possible widespread presence of hepatitis A virus subgenotype IIIA in Japan: recent trend of hepatitis A causing acute liver failure. *Hepatology Research*, 42: 248-253 (2012)
  14. Ishii K., Li T.C., Yoshizaki S., Shiota T., Kato T., Takeda N. and Wakita T. Cloning of permissive and nonpermissive human hepatoma cell lines for hepatitis E virus infection. *Hepatology International*. 6: 292 (2012)
  15. Ishii K., Kiyohara T., Yoshizaki S., Wakita T., Shimada T., Nakamura N., Nakashima K., Tada Y. and Noda M. Epidemiological and genetic analyses of a diffuse outbreak of hepatitis A in Japan, 2010. *Journal of Clinical Virology*, 53, 219-224 (2012)
  16. 石井孝司、清原知子 A型肝炎ワクチン BIO Clinica 28: 25-29 (2013)
  17. 石井孝司、脇田隆宇 海外におけるA型肝炎集団発生 -わが国への警鐘- 化学療法の領域 28: 984-992 (2012)
  18. 石井孝司 2010年春季のA型肝炎のdiffuse outbreakの分子疫学的解析 消化器内科 54: 233-238 (2012)
- ### 2. 学会発表
1. Ishii K., Kiyohara T., Yoshizaki S., Shimada C., Nakamura N., Tada Y., Noda M. and Wakita T. Epidemiological and genetic analysis of a diffuse outbreak of hepatitis A in Japan, 2010. Asian Pacific Association for the Study of the Liver. Bangkok, Thailand, February 17-20, 2011.

2. Ishii K. Surveillance of hepatitis A virus in Japan. Research Forum for the Tohoku-RITM Collaborating Research Center for Emerging and Reemerging Infectious Diseases. Manila, Philippines, December 10, 2010.
3. Yokokawa H., Akazawa D., Moriyama M., Nakamura N., Mochizuki H., Suzuki T., Kato T., Ishii K. and Wakita T. Development of a purification method of highly purified HCV virion for industrial production. 17th International Meeting on HCV and Related Viruses, Yokohama, Japan, September 10-14, 2010.
4. Moriyama M., Akazawa D., Yokokawa H., Nishimura K., Nakamura N., Mochizuki H., Suzuki T., Kato T., Ishii K. and Wakita T. The exploration of effective adjuvant for HCV vaccine to induce neutralizing immunoglobulin in mice. 17th International Meeting on HCV and Related Viruses, Yokohama, Japan, September 10-14, 2010.
5. Suzuki R., Akazawa D., Ishii K., Matsuura Y., Wakita T. and Suzuki T. Efficient production of trans-complemented hepatitis C virus particles: Use for study of viral entry process. 17th International Meeting on HCV and Related Viruses, Yokohama, Japan, September 10-14, 2010.
6. Li T.C., Liu R., Yoshizaki S., Ishii K., Miyamura T., Takeda N. and Wakita T. The stability and inactivation of hepatitis E virus grown in cell culture. 9th International Symposium on Positive-Strand RNA Viruses, Atlanta, USA, May 17-22, 2010.
7. Suzuki R., Akazawa D., Ishii K., Matsuura Y., Wakita T. and Suzuki T. Use of trans-complemented hepatitis C virus particles for study of viral entry process. 9th International Symposium on Positive-Strand RNA Viruses, Atlanta, USA, May 17-22, 2010.
8. 森山正樹、赤澤大輔、横川 寛、中村紀子、鈴木哲朗、石井孝司、脇田隆字：培養細胞由来 HCV 粒子ワクチンの免疫誘導能と最適アジュバントの検討、第 14 回日本ワクチン学会、平成 22 年 12 月、東京
9. 石井孝司、清原知子、吉崎佐矢香、脇田隆字、島田智恵、中村奈緒美、多田有希、野田 衛：2010 年に日本で多発した A 型肝炎の分子疫学的解析、第 58 回日本ウイルス学会、平成 22 年 11 月、徳島
10. 石井孝司、吉崎佐矢香、杉山奈央、加藤孝宣、李 天成、武田直和、脇田隆字：E 型肝炎ウイルスの感染性を規定する宿主側因子の探索、第 58 回日本ウイルス学会、平成 22 年 11 月、徳島
11. 白土東子、熊谷安希子、伊藤浩美、古川早苗、成松 久、石井孝司、染谷雄一、脇田隆字、久保田智巳：X 線結晶構造解析によるノロウイルスと血液型抗原の結合解析、第 58 回日本ウイルス学会、平成 22 年 11 月、徳島
12. 鈴木亮介、斎藤憲司、赤澤大輔、石井孝司、松浦善治、脇田隆字、鈴木哲朗：C 型肝炎ウイルスの *trans*-packaging 型粒子を用いた感染機構の解析、第 58 回日本ウイルス学会、平成 22 年 11 月、徳島
13. Ishii K., Kiyohara T., Yoshizaki S., Wakita T., Shimada T., Nakamura N., Tada Y. and Noda M. Epidemiological and genetic analyses of a diffuse outbreak of hepatitis A in Japan, 2010. 15th International Congress of Virology, Sapporo, Japan, September 11-16, 2011
14. Noda M., Tada Y., Uema M., Nakashima K., Shimada T., Nakamura N., Kiyohara T. and Ishii K. Food hygienic investigation on hepatitis A cases in the spring of 2010, Japan. 15th International Congress of Virology, Sapporo, Japan, September 11-16, 2011
15. Akari H., Iwasaki Y., Mori K., Ishii K., Maki N., Iijima S., Yoshida T., Okabayashi S., Katakai Y., Lee Y.J. and Saito A. Long-term persistent GBV-B infection and development of a progressive chronic hepatitis C-like disease in marmosets. 15th International Congress of Virology, Sapporo, Japan, September 11-16, 2011.
16. Uema M., Aoki N., Aoki S., Furuya Y., Nishio O., Shibata S., Kodaira A., Ishii K. and Noda M. Role of imported seafood as a vehicle of hepatitis A viruses. 15th International Congress of Virology, Sapporo, Japan, September 11-16, 2011
17. Someya Y., Shirato H., Kumagai A., Ito H., Furukawa S., Wakita T., Ishii K., Narimatsu H. and Kubota T. Structural basis for recognition of Lewis A antigen by norovirus. 15th International Congress of Virology, Sapporo, Japan, September 11-16, 2011
18. Ishii K., Kiyohara T., Yoshizaki S., Shimada C., Nakamura N., Tada Y., Noda M. and Wakita T. Epidemiological and genetic analysis of a diffuse outbreak of hepatitis A in Japan, 2010. Asian Pacific Association for the Study of the Liver. Bangkok, Thailand, February 17-20, 2011.
19. Li T.C., Song S., Yang Q., Ishii K., Takeda N. and Wakita T. The stability and inactivation of hepatitis E virus grown in cell culture. Asian Pacific Association for the Study of the Liver. Bangkok, Thailand, February 17-20, 2011.