

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：83907

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590166

研究課題名(和文) ノロウイルスとサポウイルスの網羅的検出による地域流行像の解明

研究課題名(英文) Characterization of epidemic features of Norovirus and Sapovirus by comprehensive detection

研究代表者

小林 慎一 (KOBAYASHI, SHINICHI)

愛知県衛生研究所・生物学部・室長

研究者番号：30139737

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：愛知県の肥育ブタにおけるNoVとSaVの感染状況を調査し、検出ウイルスについて分子疫学的に解析した。肥育ブタの腸内容物からNoV、SaVともに検出された。ブタから検出されたNoVはブタ型NoV固有の3遺伝子型に分類され、さらにヒト型NoVであるGII.2型に近縁なNoVも検出された。一方、ブタ固有な遺伝子型であるGIIIに属するSaVは検出されたが、ヒト型SaVは未検出であった。NoVおよびSaVの分子進化を把握するためには、今後ともヒトと動物における両ウイルスの継続的な感染状況調査が必要である。

研究成果の概要(英文)：A molecular biological surveillance was performed to determine the frequency and age distribution of NoV and SaV in finisher pigs and to characterize the strains prevalent in Aichi prefecture. Both NoV and SaV were detected in intestinal contents of finisher pigs. The detected NoV strains belonged to three genotypes that are known as typical porcine genogroup II (GII) NoVs. In addition, NoVs showing genetic similarity to human NoV GII.2 were occasionally identified. Typical SaVs related to known porcine genotype III were found to be present, but no human-like SaVs were detected in this study. Continuous surveillance for NoV and SaV in humans, and animals will be needed to understand the evolution of these viruses.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：環境系薬学

キーワード：ウイルス ノロウイルス サポウイルス 遺伝子解析

1. 研究開始当初の背景

ノロウイルス (NoV) とサポウイルス (SaV) は、同じカリシウイルス科に属し、ヒトの非細菌性胃腸炎の主要な原因ウイルスである。両ウイルスともに、組織培養法で増殖できないことや感染動物モデルもないことから、ウイルスの感染機構、複製機構、病原性などの基礎的な研究が遅れているのが現状である。

従来、NoV 感染症はヒト固有の感染症と考えられてきたが、近年、ブタ、ウシ、マウス、ライオン、イヌなどの哺乳動物からも NoV が検出されている。特に、ブタからはヒト由来株と相同性の高い NoV が検出されること、さらにノトバイオトブタでヒト由来 NoV の感染が成立したことから、NoV 感染症が人畜共通感染症である可能性が示唆されている。

SaV は乳幼児のウイルス性嘔吐下痢症の病原体として位置づけられてきたが、近年は、全国的に年長者での集団感染が増加傾向にあり、公衆衛生上の新たな脅威となっている。

ブタからはヒト SaV と相同性の高いウイルスも検出されることからブタがヒト SaV のリザーバーであることも想定されている。

NoV と SaV の両ウイルスともに、ゲノム組換えを起こし易く、リコンビナント株の出現頻度が高いことが報告されている。

このゲノムの組換えはウイルスの宿主への適合や病原性の変化などに関わることから、ヒトと哺乳動物の間で作出された新たなリコンビナント株が地域流行を引き起こすことが想定される。

2. 研究の目的

ノロウイルス (NoV) とサポウイルス (SaV) ともにゲノム組換えを起こし易いウイルスであることから、ヒトと哺乳動物由来ウイルスとの間で新たなリコンビナント株が生じ、地域流行株として土着する可能性がある。哺乳動物の中で、ブタは人畜共通感染症の病原体に感受性が高く、ヒトへの感染拡大に関わる頻度が高いことが知られている。

本研究では、ブタにおける NoV と SaV の感染状況を調査し、両感染症が人畜共通感染症であるか否かの位置づけを明確にする。

3. 研究の方法

愛知県内の一食肉センターに搬入された肥育ブタ (月齢 6 カ月 ~ 1 年以内) の腸内容物

を被検体とした。腸内容物を滅菌精製水で 10% 乳剤とし、遠心分離上清 (12000rpm、10 分) から Roche 社製 High Pure Viral RNA Kit でウイルス RNA を抽出した。RT-PCR 法で NoV 及び SaV 遺伝子検出を試みた。PCR 増幅産物の遺伝子配列をダイレクトシーケンス法で決定後、系統樹解析し、遺伝子型を決定した。

4. 研究成果

(1) ブタ型 NoV 検出用プライマーの設計

ブタ型 NoV (Sw/NoV) の特異的検出を目的として、遺伝子データベースに登録されたブタ由来 NoV の遺伝子情報を基に、構造タンパク遺伝子を増幅するプライマーを新たに設計し、ヒト型 NoV (Hu/NoV) や SaV と交差反応がないことを確認した。

(2) NoV の検出状況

ブタの腸内容物 240 検体について RT-PCR で Sw/NoV と Hu/NoV の検出検査を実施した。その結果、26 検体 (26/240、10.8%) が Sw/NoV 陽性であった。Sw/NoV 陽性 26 検体の遺伝子解析の結果、14 検体が GII.19、8 検体が GII.11、4 検体が GII.18 に分類された。Sw/NoV 感染状況に季節性を認めなかった。一方、18 検体 (18/240、7.5%) が Hu/NoV 陽性であった。Hu/NoV 陽性 18 検体の遺伝子型は、15 検体が GII.2、2 検体が GII.15、1 検体が GII.4 であった。Hu/NoV 検出に季節性を認め、ヒトでの流行期に合致して検出された。肥育ブタにおける NoV の感染環や Hu/NoV 増殖の有無は現時点で不明であるが、肥育ブタの間で、多様な遺伝子型の NoV が混在流行していることが明らかとなった。

(3) SaV の検出状況

ブタの腸内容物 80 検体について RT-PCR で Sw/SaV と Hu/SaV の検出を試みた結果、ヒト型 SaV は全て陰性であったが、4 検体 (5.0%) が GIII に分類される Sw/SaV 陽性であった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

(1) 小林慎一、藤原範子、安井善宏、伊藤 雅、山下照夫、藤浦 明、皆川洋子、2005 ~ 2009 年の 5 年間における A 群口タウイルス検出

状況 愛知県、病原微生物検出情報、査読なし、32、72-73、2011

(2) 水谷絵美、安達啓一、藤原範子、伊藤 雅、山下照夫、藤浦 明、皆川洋、2006 年から 2010 年に流入下水から分離されたエンテロウイルスの消長、愛知県衛生研究所報、査読なし、61、11-18、2011

(3) 藤原範子、廣瀬絵美、安達啓一、伊藤 雅、安井善宏、小林慎一、山下照夫、平松礼司、皆川洋子、愛知県における胃腸炎ウイルス検出状況（2011/12 シーズン）と遺伝子解析、愛知県衛生研究所報、査読なし、62、19-27、2012

(4) 松本昌門、小林慎一、平松礼司、皆川洋子、食品を介する感染症について、食品の包装、査読なし、43、80-87、2012

(5) Shinichi Kobayashi、Noriko Fujiwara、Yoshihiro Yasui、Teruo Yamashita、Reiji Hiramatsu、Hiroko Minagawa、A foodborne outbreak of sapovirus linked to catered box lunches in Japan, Arch Virol, 査読有り、157、1995-1997、2012

(6) Seiya Yamayoshi、Setsuko Iizuka、Teruo Yamashita、Hiroko Minagawa、Katsumi Mizuta、Michiko Okamoto、Hidekazu Nishimura、Kanako Sanjoh、Noriko Katsushima、Tsutomu Itagaki、Yukio Nagai、Ken Fujii、Satoshi Koike: Human SCARB2-Dependent Infection by Coxsackievirus A7, A14, and A16 and Enterovirus 71, J Virol, 査読有、86、5686-5696、2012

(7) 小林慎一、山下照夫、皆川洋子、サポウイルス食中毒、臨床とウイルス、査読無し、41、52-60、2013

(8) 小林慎一、中村範子、安達啓一、伊藤 雅、安井善宏、山下照夫、皆川洋子、愛知県におけるノロウイルス流行状況と分子疫学解析 - 2008/09 ~ 2012/13 シーズン -、愛知県衛生研究所報、査読無し、64、9-14、2014

(9) Kitajima M、Hata A、Yamashita T、Haramoto E、Minagawa H、Katayama H、Appl Environ Microbiol, 査読有、79、3952-3958 2013

(10) Yamashita T、Adachi H、Hirose E、Nakamura N、Ito M、Yasui Y、Kobayashi S、Minagawa H、J Med Microbiol, 査読有、63、715-720、2014

〔学会発表〕(計 10 件)

(1) Shinichi Kobayashi、Noriko Fujiwara、Yoshihiro Yasui、Teruo Yamashita、Akira Fujiura、Mamoru Noda、Hiroko Minagawa: A Foodborne Outbreak of Sapovirus Linked to Catered Box-Lunch in Japan. XVth International Congress of Virology. Sapporo, Japan, September, 2011

(2) Teruo Yamashita、Emi Mizutani、Hirokazu Adachi、Miyabi Ito、Akira Fujiura、Hiroko Minagawa: Detection and Nucleotide Sequence Analysis of New Aichi Virus in Wastewater. XVth International Congress of Virology. Sapporo, Japan, September, 2011

(3) 藤原範子、廣瀬絵美、安達啓一、伊藤 雅、安井善宏、小林慎一、山下照夫、皆川洋子: 愛知県における胃腸炎ウイルスの流行状況 (2010/11 シーズン)、第 53 回日本臨床ウイルス学会、千里ライフサイエンスセンター(豊中市)、2012 年 6 月 16 日

(4) 安達啓一、藤原範子、廣瀬絵美、伊藤 雅、安井善宏、小林慎一、山下照夫、皆川洋子: 愛知県における下水中のノロウイルスの消長と遺伝子解析、第 60 回日本ウイルス学会 学術集会、大阪国際会議場(大阪市)、2012 年 11 月 14 日

(5) 小林慎一、藤原範子、安井善宏、山下照夫、皆川洋子: 愛知県における肥育ブタからのノロウイルス検出状況 (2011/12 シーズン)、第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪国際会議場(大阪市) 2012 年 11 月 14 日

(6) 山下照夫、安達啓一、廣瀬絵美、藤原範子、伊藤 雅、安井善宏、小林慎一、皆川洋子: 下水からのアイチウイルス及びイヌ由来コブウイルスの検出と遺伝子解析: 第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪国際会議場(大阪市)、2012 年 11 月 14 日

(7) 山下照夫、伊藤 雅、皆川 洋子: アイチウイルスとヒトパレコウイルス 3 型の発見と臨床像、第 54 回日本臨床ウイルス学会、倉敷市芸文館(倉敷市) 2013 年 6 月 8 日

(8) 小林慎一、中村範子、安達啓一、伊藤 雅、安井善宏、山下照夫、皆川洋子: 平成 24 年度の愛知県におけるノロウイルスの検出状況 (12/13 シーズン)、第 61 回日本ウイルス学会学術集会(神戸市)、2013 年 11 月 11 日

(9) 伊藤 雅、安達啓一、山下照夫、皆川洋子：愛知県における Human parechovirus 3 型 (HPeV-3) 抗体保有状況の変動、第 61 回日本ウイルス学会学術集会 神戸市、2013 年 11 月 11 日

(10) 山下照夫、安達啓一、廣瀬絵美、中村範子、伊藤 雅、安井善宏、小林慎一、皆川洋子：イヌ糞便及び下水からのコブウイルスの検出と遺伝子解析、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸市、2013 年 11 月 11 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 慎一 (KOBAYASHI SHINICHI)
愛知県衛生研究所・生物学部 ウイルス研究室・室長
研究者番号：30139737

(2) 研究分担者

山下 照夫 (YAMASHITA TERUO)
愛知県衛生研究所・生物学部・部長
研究者番号：40402177

安達 啓一 (ADACHI HIROKAZU)
愛知県衛生研究所・生物学部 ウイルス研究室・主任
研究者番号：60564854

廣瀬 絵美 (HIROSE EMI)
愛知県衛生研究所・生物学部 ウイルス研究室・技師
研究者番号：20525802

中村 範子 (NAKAMURA NORIKO)
愛知県衛生研究所・生物学部 ウイルス研究室・技師
研究者番号：10518757