

19980071

厚生科学特別研究事業  
平成10年度研究報告書

ウイルス性食中毒原因の遺伝子検査標準法  
確立と全国行政対応整備に関する研究

著作・制作  
全国ウイルス性食中毒研究班

はじめに

厚生科学全国ウイルス性食中毒研究班は、平成3年に設立したウイルス胃腸炎下痢症研究班が発展継続したものである。私は班長として日本ウイルス学会、日本臨床ウイルス学会、全国地方衛生研究所協議会衛生微生物学技術協議会など関係団体に設立の主旨と研究戦略を説明提案し、厚生科学研究事業や健康福祉関連の厚生事業団（千代田生命、大同生命）などから研究助成を頂きながら全国都道府県を網羅する広域共同研究調査を展開した。平成5年には、それまで原因不明とされてきた非細菌性食中毒の全国実態を明らかとするべく班名を「食品媒介ウイルス性胃腸炎集団発生実態調査研究班」に改め、1990年から1995年までの5年間に限り全国の非細菌性原因物質不明の食中毒事件、有症苦情事例、施設内集団発生事件を対象に計量把握のための実態調査を行い解析検討を加え班としてこれら成果を平成7年12月に食品媒介ウイルス性食中毒全国実態調査報告書にまとめた。本書は、班員のみならず全国地方衛生研究所研究者たちによる研究の集大成であった。かかる本書の発刊に要した費用は全て厚生事業団（大同生命）助成による。班成果は、内外の学会などに公表する一方、ウイルス性食中毒実態とその対応について国民に広く分かり易く理解して頂くため、新聞（朝日・毎日・共同通信等）やTVなど報道関係からの取材要望にも応え研究情報の公開に務めた。結果として、食品衛生法には認められていなかったウイルス性食中毒と病原としてのウイルスが公的法的にも認識して頂ける大きな転換点を向かえることとなり、平成9年5月30日の食品衛生法改正で小型球形ウイルス（SRSV）を代表としたウイルスが同法史上に初めて登場し、ウイルス性食中毒も法的認知を得るに至り、日本の食品衛生の歴史に大変大きな意味を持つこととなった。班では、ウイルスを食品衛生法上の公的認知を初段階目標としたが、法改正目途のついた後はウイルス遺伝子診断学や遺伝子研究などの第二段階に専念するべく平成8年からはウイルス性胃腸炎研究班と名称を戻し、食中毒原因究明対策のためのSRSV遺伝子検査法の統一化と検査指針の作成に努めた。

この検査指針は食品衛生法改正前の平成9年1月、厚生省生活衛生局の要望に応え提出したものがわが国初の食品媒介ウイルス性食中毒検査法として全国通知され、各地方行政で食中毒対策に用いられることとなった。この検査法は暫定的であり、一般的な方法とするにも改良が必要であったし、迅速簡便かつ効率的検査法への確立に班としては責任があると常に考えていた。平成9年度からは厚生科学特別研究事業に認めて頂いたことで現厚生科学全国ウイルス性食中毒研究班へ改組し、広域共同研究プロジェクト体制のもとに研究開発を行っている。平成9年11月、厚生省はウイルス性食中毒検査体制確立に向け、全国地方衛生研究所（70機関：47都道府県と23指定都市）と2検査所（検査所職員も技術研修対象に含めることを研究班長として強く要望した）検査技術職員対象に国立公衆衛生院にてウイルス遺伝子診断技術研修を実施した折、班では講義や遺伝子診断技術・電顕形態学診断技術指導のため研究者派遣人選に協力した。

本班は、地方衛生研究所など国公立研究機関から約70名の分担・協力研究者による地道な努力で支えられてきた。本研究ではまた国内ウイルス性食中毒についての膨大なSRSV遺伝子配列決定データの蓄積がされてきている。これらは第一線の研究者による先端的な高度技術とデータ解析力に支えられた研究プロジェクト戦略の成果であり、研究者の平等原則を唱えた広域研究の成功例ともいえる。得られた成果は班員に全て等しく還元すると共に、著作権や発表優先権は等しく班員に帰属するものである。

研究班を代表し各研究者の精力的な研究姿勢がこれからも長く続けられることを期待して止まない。

平成11年4月8日

厚生科学特別全国ウイルス性食中毒研究班

主任研究者： 川 本 尋 義

Hroyoshi Kawamoto, Ph.D.

岐阜県生物産業技術研究所

元 岐阜県保健環境研究所

## 研究報告目次

総括研究報告編	1～6頁
分担研究報告集編	7～77頁
検査法・プロトコール編	79～182頁
資料編	183～191頁
会議編	192～195頁
学会等研究報告編	196～199頁

# 研究方針

## 1 ウイルス遺伝子検査法の改良開発（平成9～10年度）

本班では、ウイルス性食中毒検査指針を更に簡便で迅速かつ効率的な検査法へと改良開発し厚生省へ提案する。

## 2 輸入食品のウイルス学的安全性試験（平成10年度）

国内生産のみならず食品の輸入自由化や輸入量増加に伴う食品の安全性に鑑み生鮮魚介類のウイルス汚染実態の調査を実施し、国民の食の安全と保全を目的とした将来の食品衛生監視方向を模索検討する。

## 3 ウイルス性食中毒の疫学（平成9～10年度）

北海道から沖縄地域まで国内縦断18都道府県のウイルス性食中毒実態を調査し、食品衛生法の改正前後の状況を比較解析する。

## 4 行政対応整備政策への提案（平成10年度）

食品媒介ウイルス性食中毒「ウイルス汚染食品による直接健康被害」の原因究明とそれら発生の低減・防止に向けて、国民への食品の安全供給と監視のあり方を検討し行政施策に向けての提言を行う。

## 5 陸水環境生態系ウイルス動態調査とその対策研究（平成11年度）

SRSVは、ヒトからヒトへ食品や媒介物を介し汚染物が経口伝播し水平感染する胃腸炎ウイルスである。厄介なことに耐水・耐エーテル・耐酸・耐アルカリの大変強い小型球形のエンベロープを持たない裸RNAウイルス（ヒトカリシウイルス）である。ただSRSVについての救いは未だ死亡例がないことである。感染源（ヒト）から下水などを経て浄水場や、あるいは各家庭簡易浄化槽から河川に放流された環境水は最後には海に至り沿岸養殖などにウイルス汚染を引き起こし養殖かき等汚染食品の摂食によりウイルス性食中毒が起きると推定される。だが、陸水環境のSRSV生態を明確に説明できるデータは殆どない。従って、本班は平成11年度の研究主要目標を陸水環境試料からのウイルス検査法開発とその応用（環境水系の指標化など）をめざし、ウイルス環境生態調査を実施予定。陸水環境のウイルストラップが効率的に可能となればウイルス性食中毒発生の減衰に効果が期待できる筈で、ウイルス制御技術はSRSVだけに止まらずヒトに危険な他の経口感染ウイルス制御にも役立つ。

## 平成10年度厚生科学特別研究事業研究概要

- 1) 疫学: ウイルス性食中毒事例、感染症サーベイランス対象疾病の散発・集団発生胃腸炎下痢症の国内発生実態把握し、食品衛生法改正前後の国内実態を比較検討した。

次年度は陸水環境系SRSV生態動向把握調査の予備調査を実施。

- 2) 検査法改良開発: 検体からのSRSVウイルス遺伝子検出検査法確立に向け班内統一化を図るべく以下について総合検討した。

- ウイルス濃縮精製法の簡素化と効率向上検討
- ウイルス遺伝子(ssRNA)の効率的安定抽出法の検討
- 逆転写遺伝子連鎖増幅(RT-PCR)法改良
- ウイルス遺伝子検査法のフローチャートとプロトコル規格化

RNAの効率的抽出とcDNA転写効率向上、試料中の他種生物由来遺伝子コンタミと抽出阻害因子の効果的防除、簡便手技であることが改良点。

核酸抽出には効率的かつ製品管理されたメーカーキットをも比較検討対象とし正規導入方向も含め、RT-PCR反応の簡素化のためRT(逆転写)とPCR(遺伝子連鎖増幅)は同一チューブ内反応するなどを検討した。

- 検査法とウイルス性食中毒の疫学は第11回国際ウイルス学会にて報告予定

- 3) SRSV遺伝子解析: 国内SRSVを遺伝子配列より動態解析するため、検出遺伝子の塩基配列決定と相対比較を解析した。平成10年度(本研究継続2年次)までに、班員の決定したSRSV塩基配列”株”データを集積した結果、170本以上の配列をもとに検討した。国内株SRSV遺伝子特性を明らかにするべく、国外SRSV登録遺伝子情報とも塩基配列とアミノ酸配列により個別系統樹解析を行い相互検討した。その結果、わが国には国外株にはない特異な遺伝子群型(本年8月の国際ウイルス学会にて新遺伝子群型を提案予定: 名称は後日班として命名する予定)が鑑別された。

国内SRSV遺伝子群型出現傾向は班調査開始以来、Norwalk-likeに代表されるG1(Cenogroup 1)に比し、Snow Mountain-likeに代表されまた班により提案予定の仮称Japonica群(新クラスタ JPN-1,2)もG2に含めると圧倒的にG2出現が見られた。仮称Japonicaは、これまでの検出プライマーペア(#35NW/36NW MR3/4、#81NW/#82NW SM YR22R/Fなど)による通常検査での検出困難な事例出現の傾向もみられ、日本型SRSVを含め広範に検出するための新たなプライマー設計の必要性を再確認した。

研究班ではCRF1領域で200bp~300bpのPCR産物サイズが新たに検出できるシステム構築を検討した。

- 4) 検出用新ユニバーサルプライマーの設計: 行政的見知からはSRSV検出に群型Gタイプの決定は必要なく、ウイルス性食中毒原因推定がSRSVか否かの判別が課題であり、広く検出できるユニバーサルプライマーが求められる。現行RT-PCRにて採用している検出用プライマーの適合性再検討から新規ユニバーサルプライマーの配列設計を国内160本と国外株を比較しデザインした。

- 新プライマー配列は遺伝子登録し、学術論文発表にて公開予定
- 遺伝子解析成果とプライマー設計は第11回国際ウイルス学会にて報告予定

## 5) 陸水環境生態系ウイルスの動態調査(平成11年度)

S R S Vを河川・海洋環境汚染ウイルス指標として位置づけ、ウイルス生態学的環境調査のため環境試料からのウイルス検出(モニタリング)法を開発し、ウイルス制御に向けた生態学的調査研究を平成11年度から展開する。平成10年度には岐阜県や名古屋市などの予備調査地域で下水道水を月別に採取し、ウイルスモニタリングシステム確立をめざしS R S Vウイルス検出動向を予備調査している。モニタリングシステムでは汚水サンプル量、検査必要量、前処理行程、ウイルス抽出、濃縮、粗精製、遺伝子抽出、RT-PCR反応システム、ハイブリシステムまたはシーケンシングなど一連の処理作業の検討とS R S Vの水系出現の季節性、頻度などアウトラインを把握することにある。

### ウイルス生態予備調査概要

班長の岐阜地域予備調査によると11月中旬から集中下水にS R S Vが出現し、2月初旬には検出されなくなった。この季節性は乳幼児ウイルス性胃腸炎からS R S V検出がされる冬季流行期と合致することが明らかとなった。

サンプル総量は1リッター程度を採水し、1回の検査量は100mlを使用。集中下水道の汚水(原水)指標のBOD(生物学的酸素要求量)の平均は200程度で、簡易浄化槽からの放流水の高度BOD値に比して汚水原水といえども格段に低いものが終末処理場へ流入していたことになる。ウイルス濃縮には遠心上清からのPEG塩析法と超遠心分画法を比較検討した。ウイルス遺伝子RNA抽出には、これまで最も高効率かつ安定抽出が可能であったセパジーンRVRを使用。S R S V/ORF1をRT-PCRにて1チューブリアクションで実施。アガロース電気泳動によるウイルス遺伝子合成サイズのバンドの確認の後、PCR産物はハイブリダイゼーションにてS R S V特異性を確認した。

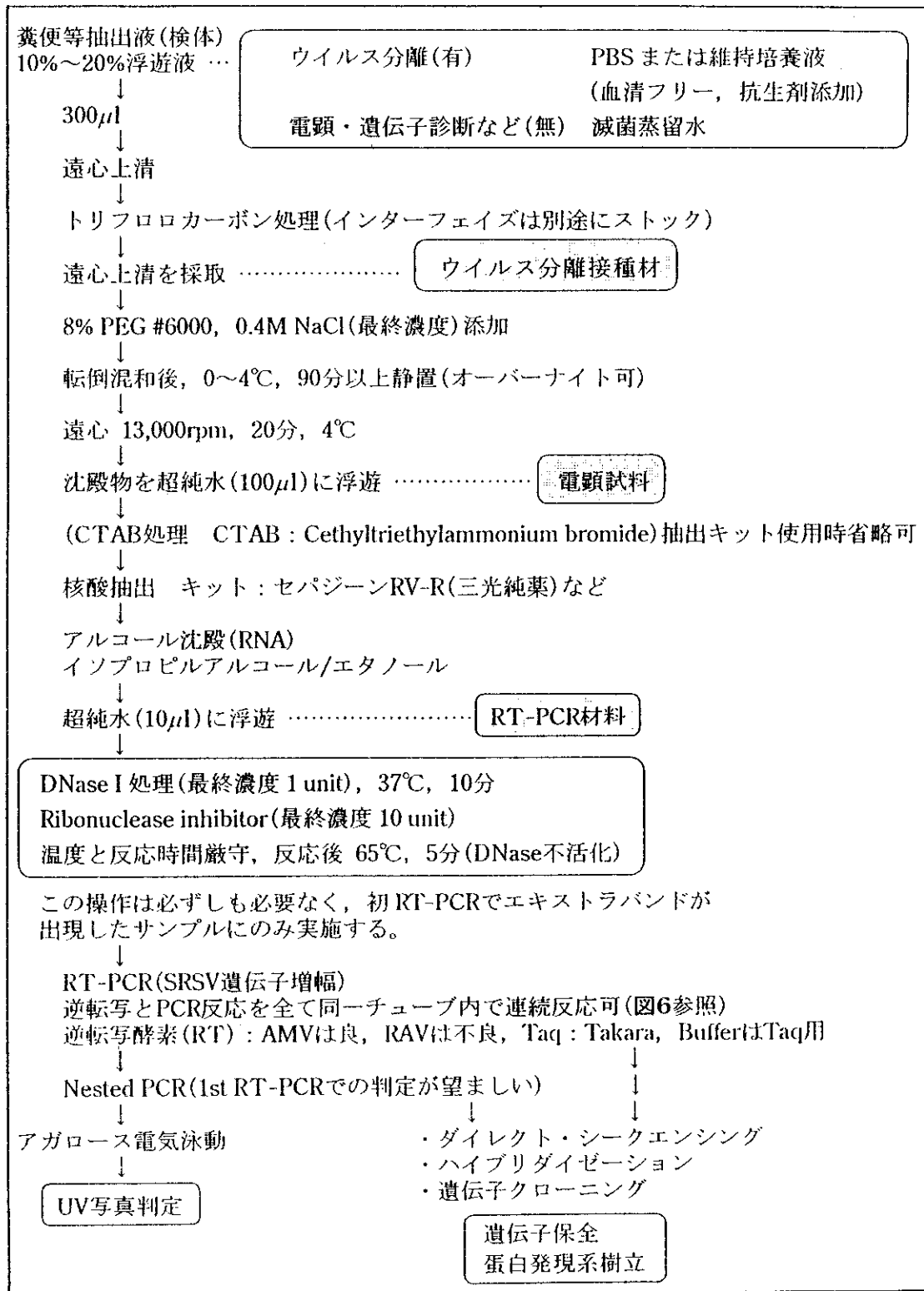


図1 SRSVのRT-PCR法術式

注

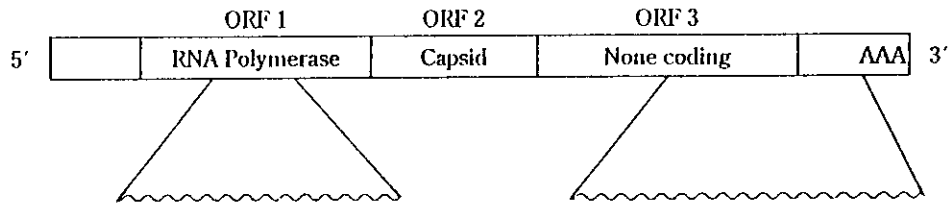
A トリフロロカーボン処理抽出について

従来は等量トリフロロカーボン処理だがフロン対策上使用は好ましくない。処理を要する場合、有機溶媒水層2分配抽出精製法(クロロホルムで代用)とする。

B RT-PCR(逆転写遺伝子連鎖増幅)反応の方式について

- 1) ワンチューブリアクション法 RTとPCRを同一チューブ内で連続実施  
条件は上記のとおり。川本尋義博士(岐阜県生物産業技術研究所)の方法
- 2) ツーステップリアクション法 RTとPCRを2段階に分けて実施する。  
条件は本書の検査法・プロトコール編の該当する術式を参考とすること。  
推奨は斎藤博之博士(秋田県衛生科学研究所)のものが理想的。

RT-PCR for genogroup 1 (G1) ; Nolwark (NW) like and Chiba (JPN),  
genogroup 2 ; Snow Mountain (SM)-like and Yuri (JPN)



First RT-PCR  
 (4475) 36 → 470bp ← 35 (4944) Chiba #1 → 682bp ← Chiba #2  
 (4485) Yuri 52F → ← Yuri 52R (4954)  
 Nested A (4721) 69 → 152bp ← 39 (4873)  
 B (4544) NW82 → 330bp ← 81 (4869)  
 C SM 82 → 330bp ← 81

プライマーセット  
 First RT-PCR用

	プライマー	塩基配列	アライメント・極性
米国 G1 ノーウォーク株	36	ATAAAAAGTTGGCATGAACA	4487 → 4505
	35	CTTGTGGTGGTGGAGGCCATAT	4936 ← 4877
日本 G2 由利株	Yuri 52F	CAATCAGAGTTGGCATGAA	4485 → 4503
	Yuri 52R	TGTTGGGATCAGCCCGTA	4937 ← 4954
カナダ G2 トロント株	MR 3	CCGTCAGAGTGGGTATGAA	4485 → 4503
	MR 4	AGTGGTGGTGGAGGCCGTA	4937 ← 4954

Nested PCR用(最初のRT-PCRに用いても可)

日本 G1 千葉株	Chiba #1	GATTTTATCAATTAAAGCC-TGTGG	6882 → 6906
	Chiba #2	GGCAA [ T / C ] CT [ A / G ] TC-TGTATTGAAATA	7541 ← 7568
日本 G2 由利株	Yuri 22F	ATGAATGAGGATGGACCCAT	4505 → 4524
	Yuri 22R	CATCATCCCCGTAGAAAGAT	4858 ← 4877
米国 G1 ノーウォーク株	NV 82	TCATTTGATGCAGATTA	4555 → 4572
米国 G2 スノーマウンテン株	SM 82	CCATATGATGCAGATTA	4555 → 4572
米国 G1 ノーウォーク株	NV 81	ACAATCTCATCATCACCATA	4865 ← 4884

図 2 SRSV 遺伝子模式図と現在使われているプライマー

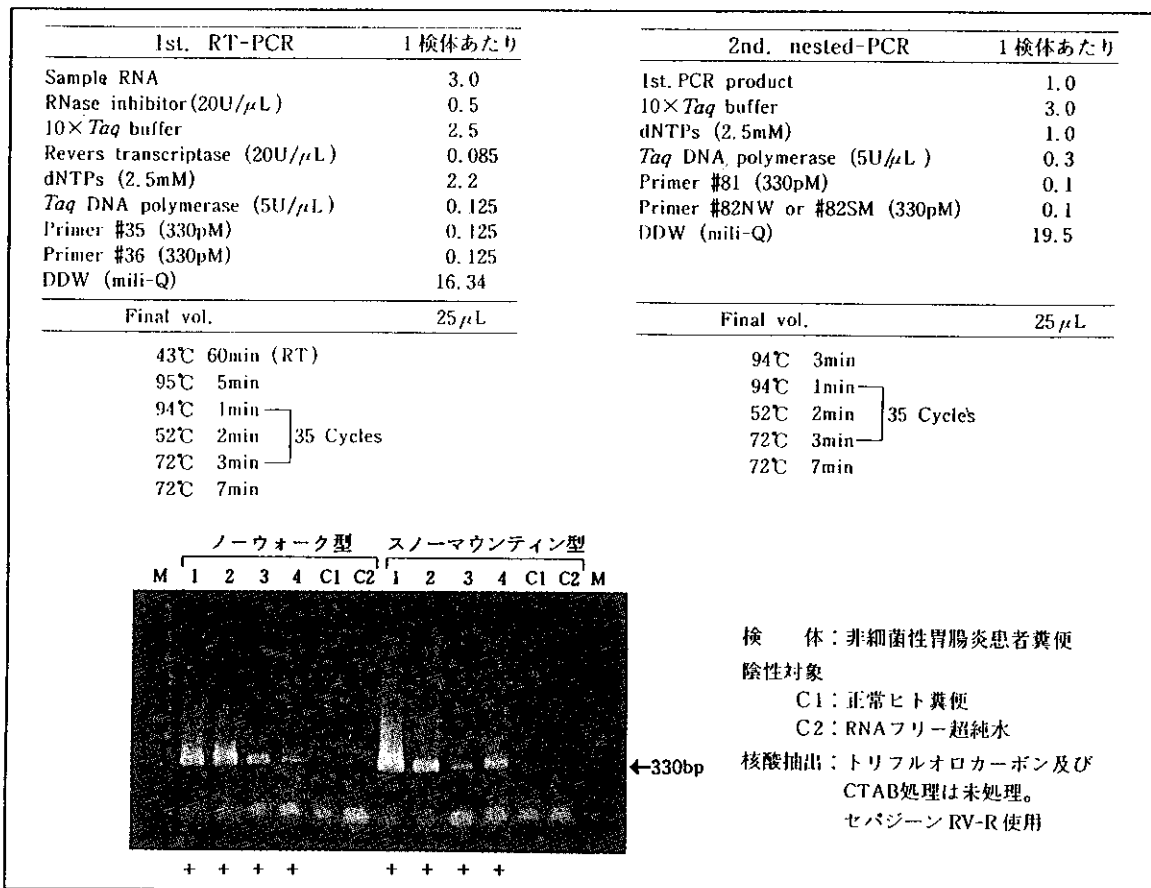


図 3 RT-PCRによるSRSV遺伝子の検出



表 2 UPGMAによる遺伝子のタイピング

Genogroup	AAS	rNA	Strain name	Cluster (Yamazaki)
Type 2B	100%	98%	広島03.4 広島05	北海道05
	100%	98%	広島09 広島10 広島18	北海道18
	100%	100%	大阪05.10.12.13.17 横浜02	北海道04
	100%	98%	東京07 東京04 東京10	北海道07
	98%	98%	大阪41.51 埼玉03 大阪36 北海道20	広島13
	100%	100%	大阪04.07.08.18 広島19	Cluster 7
	100%	98%	広島08 広島07 広島01	Cluster 8
	100%	100%	大阪47.52 大阪46	Cluster 6
	100%	98%	大阪48 広島14	Cluster 5
	100%	98%	岐阜02 岐阜03 岐阜06 東京11 東京06	Cluster 1
Type 2A	100%	99%	横浜03.04 東京03.05 千葉01.02 新潟01	Cluster 1
	100%	98%	横浜05 東京02 北海道19 北海道15	Cluster 1
	100%	98%	横浜06 横浜01 広島22 東京01	Cluster 1
	100%	98%	大阪03 福岡01 福岡02	Cluster 1
	100%	98%	青森01030405060708 大阪53 広島16	Cluster 1
	100%	98%	愛媛01 広島23 愛媛10	Cluster 1
	100%	100%	青森02091011121314 北海道08 北海道10 北海道14	Cluster 1
	100%	100%	北海道02 北海道10 新潟02	Cluster 1
	100%	98%	大阪02.09 名古屋02 名古屋01 北海道06	Cluster 1
	98%	98%	大阪44 福岡02 大阪49 大阪39 大阪50 岐阜04 広島12	Cluster 1
Type 2D	100%	100%	北海道11 北海道09 北海道12 広島15 広島17	Cluster 9
	100%	98%	Yuri	Cluster 9
	100%	98%	広島21 北海道13	Cluster 3
	100%	98%	広島02	Cluster 2
	100%	98%	大阪35 東京09 北海道17	Cluster 2
	100%	98%	大阪45 岐阜01	Cluster 2
	100%	100%	大阪32.45 福岡04 福岡03	Cluster 4
	100%	100%	宮城01.02.03	Cluster 4
	100%	98%	東京08 北海道16	Cluster 1
	100%	98%	大阪11.30 北海道01	Cluster 1

表 1 遺伝子型の地域、年代、プライマーセットによる分類

Region	Genogroup	Strain	size	Strain
ORF1	Type 1	20	430bp	29
	Type 2A	63	330bp	11
	Type 2B	56	292bp	60
	Type 2C	17	81-290bp	27
	Type 2D	6	80bp	36
	Yuri	1	Total	163
Subtotal		163		
ORF2		10		
ORF3		3		
Total		176		

発生地域別	1	2A	2B	2C	2D	Yuri
都道府県	1	2	1	1	1	1
北海道	4	3	5	5	3	20
青森		14				14
宮城	3					3
新潟		1		1		2
埼玉			1			1
東京	2	6	3			11
千葉		2				2
横浜		5	1			6
長野			1			1
岐阜	1	2		1		4
名古屋				2		2
大阪	6	14	20	6	1	48
広島	2	5	13	1	2	23
愛媛		10	12			22
福岡	2	1		1		4
Total	20	63	56	17	6	163
Percentage	12.3%	38.7%	34.4%	10.4%	3.7%	0.6%

注

1) 班員による全国地域のSRSSV検出状況は、遺伝子群型(ジェノグループ: Gタイプ)はこれまでにG2が99%以上と布で、G1は1%未満であった。遺伝子配列解析に供した「検出株遺伝子」Gタイプ分布は、必ずしも上記の出現傾向を反映しない。理由はG1とG2遺伝子特性解析のため任意にG1 SRSSV株情報も選んだ。

2) 遺伝子特性の解析の結果、本邦ではG2は少なくとも4グループ以上に分類された。この分類法は暫定的にタイプ2Aから2Dとしたが、最終的にユリ株型は2Dとなる。従って、2Cと2Dは群型として「PN-1、2」は「PN-2」として国際ウイルス学会(学会等研究報告欄)にて提案予定。

# 分担研究報告編

## 北海道において検出された小型球形ウイルスの遺伝子解析

分担研究者 沢田春美  
 協力研究者 吉澄志磨 玉手直人 大山 徹 (北海道立衛生研究所)

- 研究要旨**
- 1998年3月～1999年2月までの12ヶ月間に北海道で発生した食中毒様胃腸炎6事例について、RT-PCR法および電顕法によって病原検索を行ったところ、5事例が小型球形ウイルス(SRSV)によるものと判明した。検出数は糞便74件中44件、吐物8件中1件であった。食品17件からは検出されなかった。
  - 検出されたSRSVのgenotypeは、カキ関連の1事例ではIおよびII、その他の事例ではIIであった。

**A. 研究目的**

- 北海道において食中毒様胃腸炎事例から検出されたSRSVについて遺伝子解析を行い、本ウイルスによる急性胃腸炎の動向を分子疫学的に究明する。
- 電顕法によるSRSVの検出状況をも参照し、PCR法の改良を図る。

検出されたSRSVのgenotypeは事例内で一致しており、いずれもIIであった。

**B. 研究方法**

- 材料** 1998年3月～1999年2月までの12ヶ月間の食中毒様胃腸炎5事例から得られた患者糞便74件、吐物8件および関連食品(非カキ)17件。
- 方法** 電顕法  
 RT-PCR法  
 RNA抽出: CTAB法  
 プライマー: MR3/4  
                   Yuri 22F/R  
                   NV36/35'  
 遺伝子解析

**D. 考察**

今回扱った事例は5例と少なかったが、同一事例からの2種類の遺伝子型検出、単一暴露を示唆する事例、RT-PCR法による検出0あるいは低率例など、内容は多彩であった。事例No. 5では、電顕法によって高率(52.3%)に検出されているが、PCR法では11.8%の低い検出率であった。SRSVによる急性胃腸炎の疫学的研究に多くの課題を提起するものであろう。

**C. 研究結果**

上記期間中に北海道でみられた食中毒事例6例中5例からSRSVが検出された。他の1事例は小学校で患者の多発したもので、C群ロタウイルスが病因であった。  
 SRSV検出事例の概略について表に示した。事例No. 1はカキを食べた2名がともに発症し、両者よりPCR法によってSRSVが検出されたケースであるが、遺伝子解析の結果、それぞれのgenotypeは異なり、GI、GIIであった。家庭料理であったためカキや調理品は保存されておらず、ウイルス検査実施には至らなかった。事例No. 2、3は幼稚園など施設内での発生で、

**E. 結論**

- 1998年3月～1999年2月に北海道でみられた食中毒事例は、SRSVによるもの5例、C群ロタウイルスによるもの1例、計6例であった。
- SRSV例ではIおよびIIの遺伝子型が確認されたが、PCR法による検出率の低下傾向がみられ、他プライマーの併用あるいは新規プライマーの設計が必要と思われる。

**F. 研究発表**

- 論文発表**  
 Microbiology and Immunology, Ohyama T. et al 投稿中
- 学会発表**  
 第50回北海道公衆衛生学会 1998年11月 札幌市  
 第73回日本感染症学会総会学術講演会 1999年3月 東京都(予定)

北海道における小型球形ウイルスの検出状況

事例No.	発生時期	発生状況・場所	検体	SRSV検出数	RT-PCR	EM	Genotype
1	1998. 3	家庭・カキ	糞便	2/2	2/2	0/2	1;GI (NV), 1;GII (B, SMA)
2	5	幼稚園	糞便	20/24	20/24	3/21	GII (A, TV)
3	10	保育園	糞便	11/22	7/22	9/20	GII (B, SMA)
			吐物	0/7	0/7	NT	
			食品	0/6	0/6	NT	
4	12	野外パーティー	糞便	2/9	0/9	2/9	
5	1999. 2	保育園	糞便	9/17	2/17	8/15	NT
			吐物	1/1	1/1	NT	NT
			食品	0/11	0/11	NT	

## 食中毒事例から検出したSRSV遺伝子解析に関する研究

分担研究者 三上稔之 青森県環境保健センター微生物部主任研究員

研究要旨：ウイルス性食中毒は1997年12月末、年が明けた1月、2月と立て続けに3事例の発生があり、SRSVの検索はそれぞれの事例の便材料から電子顕微鏡法（以下電顕法）、Nested PCR法により行った。結果は電顕法でSRSV粒子が、PCR法でもウイルス遺伝子が検出され集団発生の病因物質を明らかにした。また、その各集団発生からPCR法により検出されたSRSV遺伝子の解析を実施した。結果、シーケンスした中の200bp内において2カ所に塩基の変異がみられ、地域別のウイルスグループと同一集団発生に2種類のSRSV遺伝子が存在することを確認した。

### A. 研究目的

ウイルス性食中毒集団発生の病因物質を迅速に解明し、また、検出ウイルス遺伝子と分子疫学的解析を行い、感染経路及び感染源の解明により集団発生の拡大阻止、続発の防止を行う。

ら20%乳剤として3000rpm、20分間遠心しその上清を等量のダイフロンで処理、ポリエチレングリコールで濃縮、さらに150000×g,150分間超遠心により精製および濃縮で得られた。ウイルスRNAは電顕試料を出発材料としてISOGEN（ニッポンジーン）により抽出した。

### B. 研究方法

#### 1. 検査材料

(1)ウイルス性食中毒様集団発生の発症者便、非発症者便、調理従事者便

(2)食品、喫食残品等

#### 2. 電顕試料及びRNA抽出

電顕試料は便を滅菌蒸留水で10か

#### 3. cDNA合成

RT-PCRはRNA PCR KIT (TAKARA)を用いた。

#### 4. Nested PCR

プライマーはアウタープライマー35' /36、インナープライマーNV81 /82、一部SM82を混合して用いた。

## 5. DNA解析

糞便からの1997年4月発生事例の1検体(A-1)、A事例5検体(A-2, 3, 4, 5, 6)、B事例5検体(A-7, 8, 9, 10, 11)、C事例3検体(A-12, 13, 14)の計14検体の増幅DNAを用いてシーケンスを行い、安定部分の塩基配列を比較した。

安定部分である200bpを対象に比較し、結果は2カ所で塩基の相違がみられ、A-3, 4, 5, 6のグループIとA-1, 2, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14のグループIIの二つに分けられた。また、同一集団発生において2種類のウイルスが存在することが確認された。

## C. 研究結果

表1に示したように1997年12月末にH地域において飲食店で生カキによる感染と思われる12名の発症者が確認され、また、年が明けた1月にA地域においても、生カキによる感染と思われる発生が複数の団体客にみられ、さらに、2月にはヒト一食品一ヒトへの感染が推測される集団発生が前年12月発生の同じH地域においてみられた。それらの発生の発症者及び非発症者便を対象に電顕法によるウイルス粒子の検索、Nested PCR法によるSRSV遺伝子検出を実施した。電顕法による検出は、A・B事例で4検体からSRSV粒子が確認された。PCR法ではA事例では8名中5名、B事例では19名中15名、C事例では4名中3名からSRSV遺伝子が検出された。DNA解析結果は、増幅遺伝子330bpのシーケンスを行い、

表1 青森県内で集団発生した食中毒3事例の概要

区分	事 例		
	A	B	C
発生年月日	H9年12月	H10年1月	H10年2月
発生場所	H	A	H
患者数	12名	15名	22名
発生率	12/27 (44%)	15/19 (79%)	22/39 (56%)
主症状	下痢、嘔吐 腹痛、発熱	下痢、嘔吐 腹痛	下痢、嘔吐 腹痛、発熱
材料名	糞便(8)	糞便(21)	糞便(4)
検査結果(細菌)	陰性	陰性	陰性
ウイルス(電顕)	2/3	2/21	3/4
(PCR)	5/8	17/21	3/4
喫食状況	生カキ	生カキ	推定食品無

## D. 考察

青森県での集団発生4事例では、検出されたSRSV遺伝子200bpにおける解析により2カ所でGがAに変わっていることが確認され、検出された

PCR産物は二つのグループに分けられた。この遺伝子型の地域性をみると、H地域ではグループⅠ、A地域ではグループⅡとなり地域での違いが示唆された。しかしながら、H地域でのA事例の1検体、C事例の3検体がともにグループⅡに入ることからA事例のH地域における集団発生は、2種類が混在しており、今後、詳細な検討が必要である。

これらの検出ウイルス遺伝子は遺伝子系統樹（図1）からみると、Bristol株、Maryland6株、Hawaii株、SMA株とは異なっており、メキシコ株と比較するとグループⅠが非常に類似しており、グループⅡでは2カ所でGがAに変異している。しかし、今回検出されたウイルス遺伝子は、いずれもメキシコ株に属するものと推察される。

H地域とA地域における集団発生は2つの異なる遺伝子のウイルスによる感染と考えられることから、感染経路、感染源の解明には、検出系を含めてより一層の調査研究が必要と考えられる。

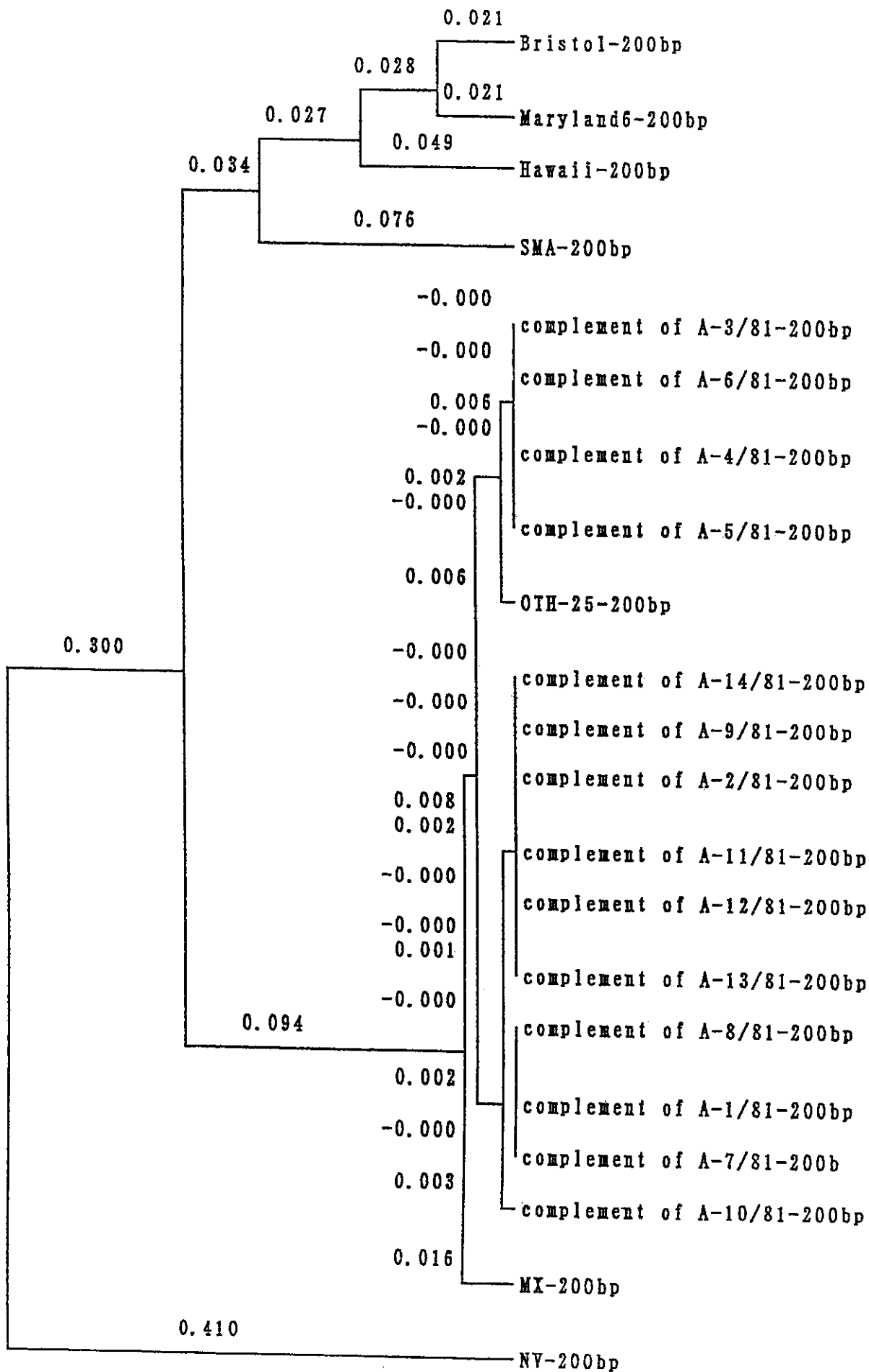
## E. 結論

1997年12月、1998年1、2月の食中毒事例は電顕法とPCR法により病因物

質がSRSVであることを明らかにした。それらの3事例のヒト由来SRSV遺伝子と1997年4月の1検体を含めて遺伝子解析を行った結果、メキシコ株に類似した2種類のウイルス遺伝子を確認した。今後感染源、感染経路を追究するために生カキや食品等からの高感度のウイルス検出系の確立と、より多くの遺伝子解析が必要であるとともに、遺伝子型による分類、さらには、本ウイルスの培養系の確立が必要と思われる。

(图 1)

Untitled-7 UPGMA Tree



## 分担研究報告書

### ウイルス性食中毒原因の遺伝子検査標準法確立と 全国行政対応整備に関する研究

分担研究者 斎藤博之 秋田県衛生科学研究所主任

研究要旨:昨年度までに RT-PCR 法のためのプライマー比較を行い一定の成果をあげたが、検体の処理方法(RNA 抽出法)に関しては十分な検討がなされていない。今年度は市販キットも含めた 8 種類の抽出法に関して、検査成績に及ぼす影響や試薬コストについて比較した。糞便検体に関しては方法間で大きな差は無く、手間とコストを基準に選んでよいことがわかった。一方、カキ検体に関しては Hot Phenol 法が最も抽出効率において優れていた。

#### A. 研究目的

SRSV 検出のための RT-PCR 法においては、プライマー選定の他に検体からの RNA 抽出法が大きな意味を持ってくる。抽出法において最終的な検査成績に及ぼす要素は「RNA の回収効率」と「酵素阻害物質の除去効率」の 2 つである。また、糞便の他に、最近検査依頼が増えつつある生カキに対しても同様に比較検討を行った。

#### B. 研究方法

比較検討のためには十分量の共通検体が必要であるが、あらかじめ定量したコクサッキー A16 を糞便及びカキ検体に加えることで解決した。すなわち、 $10^5$ TCID<sub>50</sub>/ml のコクサッキー A16 培養上清を原液とし、次の 3 種類の希釈液で段階希釈した。

1. 蒸留水
2. 10%糞便乳剤をフルオロカーボン処理したもの
3. 生カキ中腸腺の凍結融解抽出液をフルオロカーボン処理したもの

蒸留水を加えたのは、純粋な「回収効率」を比較するためである。糞便とカキに関してはあらかじめコクサッキー A16 が陰性であることを確認してある。

このようにして調製した共通試料に対して表 1 に示す 8 種類の抽出法で RNA を回収して RT-PCR を行い、どの程度の希釈まで増幅バンドが検出できるかを比較した。処

理量は各希釈試料ごとに 0.1ml である。なお、市販キットの使用条件は添付説明書に従うが、それ以外の方法については以下のとおりである。

#### CTAB 法

J. Clin. Microbiol., 30, 2529-2534, 1992 参照

#### Glassmilk 法

6M チオシアン酸グアニジン 0.3ml と Glassmilk (Glass Powder を蒸留水でスラリーとする) 10  $\mu$ l を加えて室温で 10 分放置する。遠心して上清を除き、沈澱を 1ml の NEW buffer (50mM NaCl - 50% Ethanol - 5mM Tris·HCl - 0.5mM EDTA, pH7.5) で 1 回、純エタノールで 1 回洗條する。沈澱を乾燥させてから蒸留水 50  $\mu$ l を加えて 65°C で 10 分処理して RNA を溶出させる。最後に遠心して上清を回収する。

#### Hot Phenol 法

酸性 GTC 溶液 (5.5M チオシアン酸グアニジン - 25mM クエン酸 Na - 0.5% ラウロイルサルコシン酸 Na - 0.1M 2-メルカプトエタノール - 0.4M 酢酸 Na / 酢酸で pH4~5 に合わせる) を調製する。これを試料に 0.3ml 加えて 65°C に加温する。フェノール/クロロホルム 0.4ml を加えて加温したまま 10 分間放置する (5 分後にチューブを良く振って混ぜる)。氷上で冷



やした後、遠心して水層を回収し、再度クロロホルム/イソアミルアルコールで抽出する。水層を回収してエタノール沈澱する(酢酸 Na はすでに加えられているのでこの段階では不要)。

PCR に用いたプライマーはエンテロウイルス共通で 5' ノンコーディング領域の配列を用いた(J. Clin. Microbiol., 28, 438-442, 1990 参照)。なお、全ての反応において DNase I 処理を加えた<sup>1,2</sup>。

本研究では、検査にかかるコストも体制整備のための重要なファクターとして位置付けているため、表 1 と 2 に試薬類の価格を示した。

#### C. 研究結果

図 1 に方法別、検体別の RNA 抽出効率を比較した成績を示した。糞便検体に対する抽出効率では Dr.GenTLE の成績が低かったがそれ以外はどの方法を用いても差が無かった。カキ検体では Hot Phenol 法の抽出効率が最も高く他の方法とは明らかな差が認められた。

#### D. 考察

糞便の場合は方法ごとの効率の差は無いため、コストと手間を選んでもかまわないことになる。図 2 にコストの比較を示したが、Catrimox-14 と Glassmilk 法が最も安く済む。より手間のかからない方は前者だが、糞便の性状(脂質の多い便や、キャリープレア入りの便など)によって影響を受けやすいので、ここでは安定した検査精度を得られる Glassmilk 法を推奨したい。

カキ検体では Hot Phenol 法の抽出効率が極めて高いので、通常はこれを選択すべきであろう。コストも安く済み、手間も ISOGEN-LS と同程度と考えられる。

阻害物質を含まない対照として蒸留水で希釈した試料についてもテストしたが、意外なことに糞便検体より成績が低い場合が多かった。これは不純物が逆にキャリアーの役目を果たしたものと考えられる。

そのため単純な煮沸のみの処理では損失が少なくなっている。この結果は、環境水に対してモニタリング調査を行う場合、あらかじめ適当なキャリアーを添加する必要性を示唆している。

#### E. 結論

これまでの研究では、RNA 抽出法に関する十分な比較検討がなされていなかった。これは、SRSV 陽性の糞便検体を研究材料にした場合、量に限りがあるため同一条件下の比較が困難であったことが理由である。今回は、あえて SRSV の PCR を用いずに培養可能なエンテロウイルスを健状人の糞便、及びカキ凍結融解物に添加することで RNA 抽出過程を再現した。Glassmilk 法はこれまでキット製品しか市販されていなかったためコスト的に不利であったが、「Glass Powder」を購入してスラリーにすればこの問題は解決できる。一方、カキ検体に関しては、Hot Phenol 法が最も良い結果となった。簡便さにおいては、必要試薬を可能な限りプレミックスしておけば、ISOGEN-LS と同じくらいになるし、CTAB 法よりはるかに迅速である。

#### F. 研究発表

1) Hiroyuki Saito, et. al., Application of RT-PCR designed from the sequence of the local SRSV strain to the screening in viral gastroenteritis outbreak. Microbiol. Immunol., 42, 439-446 (1998)

2) 斎藤博之、他、SRSV に起因する食中毒における易学指標としての SSCP 解析の検討、第 46 回日本ウイルス学会、東京 (1998)

図1 RNAの抽出効率比較

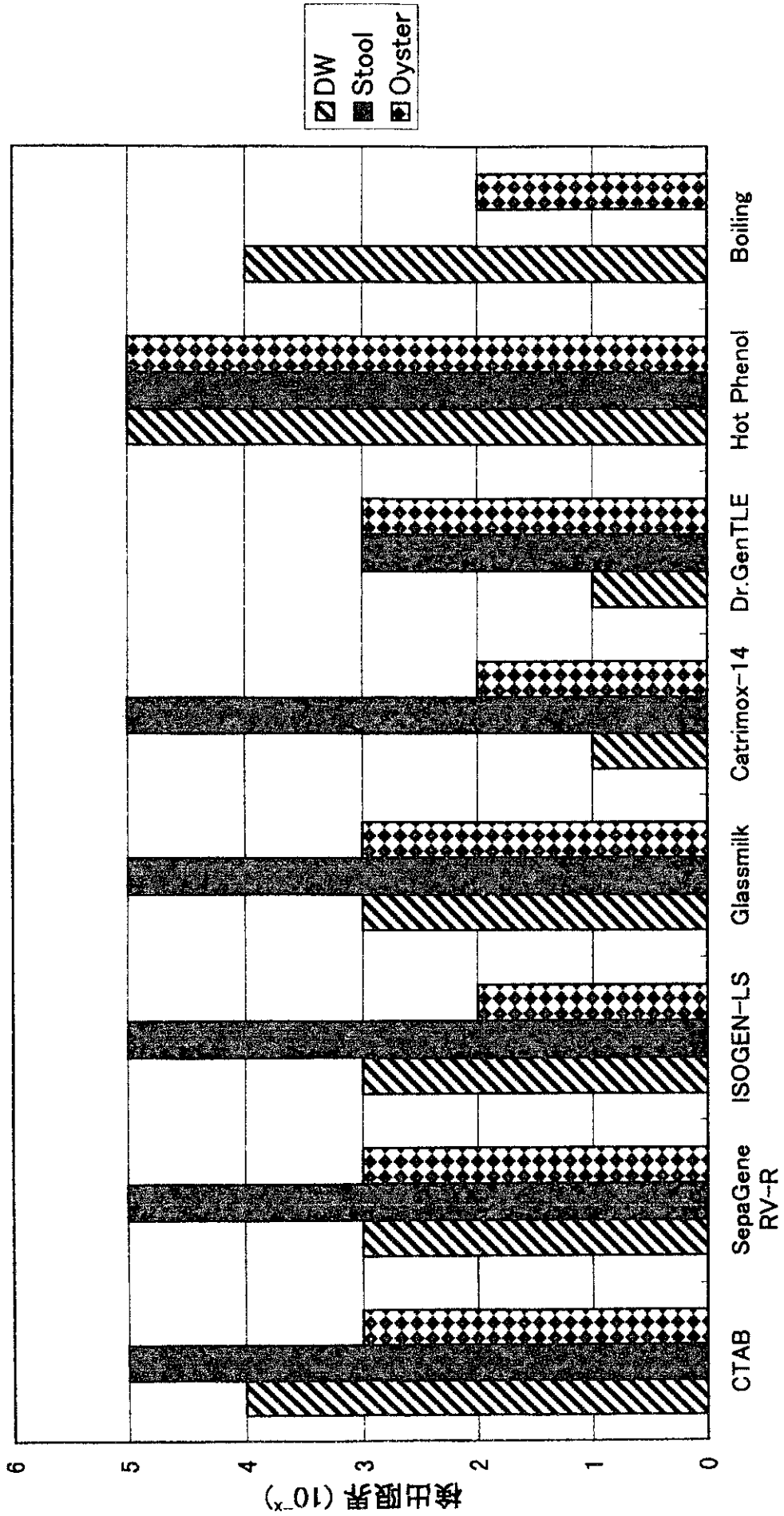


図2 抽出法別コスト比較

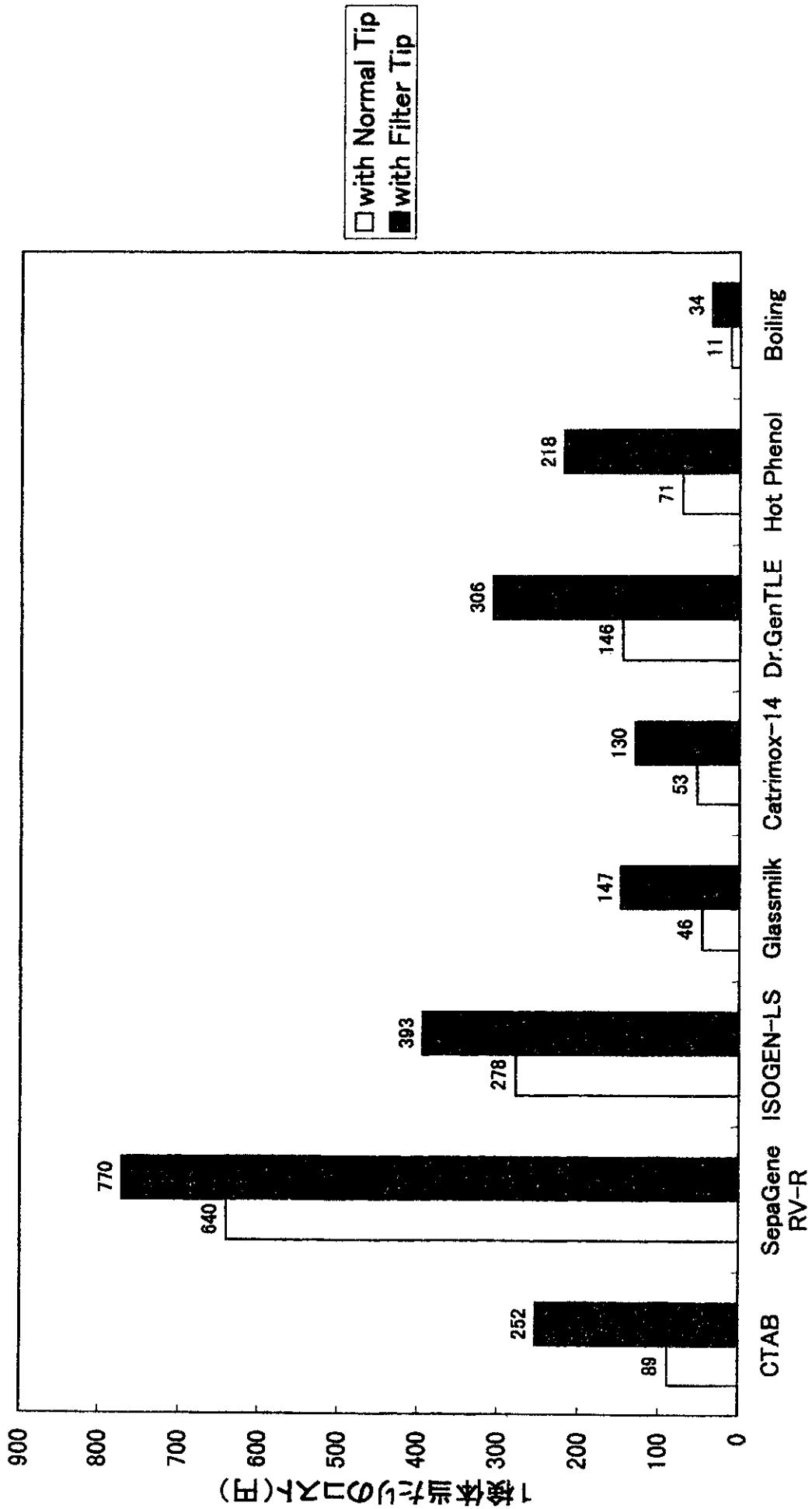


表1-1 抽出法別コスト比較(Normal Tipを使用した場合)

抽出法	キット価格(円)	処理数	1検体当たりの 試薬コスト(円)	必要チューブ数 (大)	必要チューブ数 (小)	必要チップ数	1検体当たりの 容器コスト(円)	1検体当たりの 合計コスト(円)
CTAB			33.1	3	11	5	55.4	89
SepaGene RV-R	60000	100	603.0	2	3	7	36.8	640
ISOGEN-LS	32000	133	244.0	2	3	6	34.0	278
Glassmilk			12.6	2	5	4	33.2	46
Catrimox-14	16000	500	32.0	1	2	4	21.0	53
Dr.GenTLE	20000	200	103.0	2	3	9	42.4	146
Hot Phenol			22.4	3	7	6	48.6	71
Boiling			0.0	1	1	1	10.2	11

表1-2 抽出法別コスト比較(Filter Tipを使用した場合)

抽出法	キット価格(円)	処理数	1検体当たりの 試薬コスト(円)	必要チューブ数 (大)	必要チューブ数 (小)	必要チップ数	1検体当たりの 容器コスト(円)	1検体当たりの 合計コスト(円)
CTAB			33.1	3	11	5	218.3	252
SepaGene RV-R	60000	100	603.0	2	3	7	166.9	770
ISOGEN-LS	32000	133	244.0	2	3	6	148.9	393
Glassmilk			12.6	2	5	4	133.5	147
Catrimox-14	16000	500	32.0	1	2	4	97.6	130
Dr.GenTLE	20000	200	103.0	2	3	9	202.9	306
Hot Phenol			22.4	3	7	6	195.1	218
Boiling			0.0	1	1	1	33.3	34

\* SepaGen RV-R、ISOGEN-LS、及びDr.GenTLEの1検体当たりの試薬コストには、2-プロパノールとエタノールのコスト3円が加算されている。

\*\* CTAB、Glassmilk、及びHot Phenol法のコストは表2の価格表から計算した。

\*\*\* 合計コストは1円未満を切り上げ表示した。