

図2-1 コスト計算に用いた試薬類の価格(1998年12月現在)

品名	メーカー	形状	内容量	価格(円)
チオシアン酸グアニジン	和光純薬	粉末	500g	18000
ラウロイルサルコシン酸Na	和光純薬	30%溶液	500ml	11400
クエン酸Na	和光純薬	粉末	500g	1750
酢酸Na	和光純薬	粉末	500g	1100
トリス	和光純薬	粉末	500g	5600
SDS	和光純薬	粉末	500g	3500
EDTA	和光純薬	粉末	500g	3300
NaCl	和光純薬	粉末	500g	700
2-メルカプトエタノール	和光純薬	液体	500ml	3600
2-プロパノール	和光純薬	液体	500ml	1600
エタノール	和光純薬	液体	500ml	2000
フェノール	和光純薬	結晶	500g	1360
クロロホルム	和光純薬	液体	3l	5600
CTAB	Sigma	粉末	500g	10000
Proteinase K	ニッポンジーン	20mg/ml溶液	5ml	14700
Glass Powder	ニッポンジーン	粉末	200mg	3100
グリコーゲン	ペーリンガー	20mg/ml溶液	1ml	15700

図2-2 コスト計算に用いたキット類の価格(1998年12月現在)

品名	メーカー	処理検体数	価格(円)
SepaGene RV-R	三光純薬	100	60000
ISOGEN-LS	ニッポンジーン	133	32000
Catrimox-14	ニッポンジーン	500	16000
Dr. GenTLE	宝酒造	200	20000

図2-3 コスト計算に用いた容器類の価格(1998年12月現在)

品名	メーカー	包装(本)	価格(円)	単価(円)
エッペンチューブ(相当品)	フナコシ	1000	5000	5.0
フィルターチップ 1000	フナコシ	800	14400	18.0
フィルターチップ 200	サワディー	960	9900	10.3
フィルターチップ 20	サワディー	960	9900	10.3
ノーマルチップ 1000	フナコシ	1000	2800	2.8
ノーマルチップ 200/20	フナコシ	1000	2400	2.4

分担研究報告書

ウイルス性食中毒遺伝子の検査標準法確率と全国行政対応整備に関する研究

研究者 秋山和夫 宮城県保健環境センター上席主任研究員

研究要旨 河川水より SRSV 遺伝子が検出され、SRSV が冬季に環境水中に存在することが確認された。また、SRSV はすでに健康人の低年齢層より感染し、全年齢層に幅広く侵淫していることが示唆された。

A. 研究目的

SRSV の環境水中での汚染状況および健康人における侵淫状況を把握し、汚染経路を明らかにするための資料を得る。

B. 研究方法

<材料>かき養殖海域に流出する河川水（1997年度は5河川より19件・1998年度は7河川より19件）計38件。1～6歳の健康幼児糞便（1998年11月と99年1月に採便）計106件。4～70歳の健康人血清（I市；1995年10月に採血した135件・S市；1996年1月に採血した135件）計270件を材料とした。

<前処理>河川水3000mlにポリエチレングリコールを添加、4℃・一夜攪拌後遠心し、沈殿物をDWに再浮遊した。再浮遊液を30% sucrose に重層し、30,000rpm 180min 遠心した。その沈殿物をDWで溶解しRNA抽出材料とした。糞便は10% 乳剤を遠心後、その上清をRNA抽出材料とした。

<RNA抽出>RNA抽出用材料をダイフロン処理し、6Mグアニジンチオシアネートを加え混和後ガラスパウダーを添加しRNAを抽出した。

<プライマー>NV系（1stにp36/p35'、2ndにNV82・SM82/NV81）、Yuri系（1stにMR3/MR4、2ndにYuri22F/22R）の2系統を使用した。

<PCR反応条件>NV系は食品衛生法に従い、Yuri系は94℃1min、45℃2min、60℃4minを5サイクル反応後、94℃1min、45℃1min 20sec、72℃1minを30サイクル行った。サザンハイブリダイゼーション（以下サザン）は食品衛生法に従い行った。また、一部のPCR産物についてはダイレクトシーケンスを行った。

<抗体測定>SRSV遺伝子の構造タンパク

の組み換えバキュロウイルス発現系により作製したSRSV中空粒子を抗原として酵素抗体法により測定した。使用した抗原はGenotype-1（G-1型）が3血清型（rCV・r258・r124）、Genotype-2（G-2型）が4血清型（r104・r76・r47・r7）を用いた。吸光度492nm値が陰性対照血清の2倍以上を示した検体を抗体保有者とした。なお、抗体測定は国立感染症研究所ウイルス第二部と共同で行った。

C. 研究結果

<SRSV遺伝子の検出>河川水からは1997年度にH河川より1件、O河川より2件、いずれもYuri系プライマーで検出した。1998年度はO河川からYuri系で1件、T河川からはNV系で1件検出した。健康人糞便からは4歳と6歳の幼児2件よりYuri系で検出した。この7件についてサザンを実施した結果、SRSV遺伝子であることが確認された。また、T河川より検出した遺伝子はシーケンスの結果G-1型であった。

表 抗体保有状況

年齢群	例数	I 市		例数	S 市	
		保有率 (%)			保有率 (%)	
		G-1	G-2		G-1	G-2
0～4	33	69.7	78.8	8	50.0	100
5～9	17	88.2	76.5	30	66.7	90.0
10～14	20	85.0	100	19	73.8	100
15～19	17	70.6	100	19	78.9	100
20～29	16	87.5	93.7	19	68.4	100
30～39	28	85.7	92.9	20	80.0	100
50～	4	100	100	20	80.0	95.0

＜健康人の抗体保有状況＞両市とも抗原により、保有率に若干の差は認められるが、低年齢層からすでに抗体保有者が存在し、その保有率は加齢と共に上昇する傾向が認められた。

G-1・G-2型別の抗体保有状況はI市の0～4歳群で両型に70～80%の高い保有率を示した。一方、S市においてはG-1型に0～4歳群で50%、5～9歳群で約67%と低い保有率であり、年齢群による地域差が認められた（表）。

#### D. 考察

2年間の河川水調査より5件のSRSV遺伝子が検出された。この採水時期は12月に1件、1月に3件、2月に1件といずれも水温が10℃以下の場合であった。また、Or河川において、1997年の9月・11月・98年1月に毎週採水し、経時的汚染状況を観察したところ、1月のみ2件検出された。これらの結果より、冬季に河川水がSRSVによって汚染されていることが確認された。検出した河川の流量は少な目で、しかも生活雑排水が流れ込む河川であった。

次に、SRSV遺伝子は8河川中4河川から検出され、同一河川から検出したのはOr河川のみで、特定の河川が汚染されている可能性は少ないと考えられた。また、同一時期に採取された幼児の糞便からもSRSV遺伝子が確認されたことから、SRSV感染者の糞便が河川に流れてくるものと考えられた。

さらに、健康者幼児の約2%から遺伝子が確認できたことや抗体保有率が遺伝子型により地域差があるものの多くの年齢群で保有者が存在することから、宮城県内では広範囲にSRSVは侵淫している可能性が推測できた。

#### E. 結語

1) 河川水・健康幼児糞便からSRSV遺伝子を検出したことから、冬季にかき養殖海域がSRSVの影響を受ける機会があるものと推測された。

2) 宮城県では抗体保有状況より低年齢層から高年齢層まで幅広くSRSVが侵淫していることが証明された。

# 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

主任研究者 川本尋義 (岐阜県生物産業技術研究所)

分担研究者 篠川旦 新潟県保健環境科学研究所ウイルス科長  
研究協力者 西川眞 同ウイルス科専門研究員

月の下痢発症後 66 時間を経過した回復患者の固結便でも、改良法は Nested PCR と同じ成績が得られた。

## A 研究目的

食中毒の原因究明調査は、再発防止を図るうえで迅速であることが求められる。しかし発症後時間を経過し、検査に適した検体が得られない場合が多い。そこで、RT-PCR における検出感度の増強法を検討した。

## B 研究方法

調査対象のウイルスとして、食品衛生法施行規則に規定された病因物質である小型球形ウイルス中、ノーウォーク様ウイルス属を主に検討した。材料は、表 1 に検体として示した食中毒患者便で、平成 9 年 5 月 30 日付衛食第 156 号で示された方法 (以下「標準法」という。) と感度を比較した。改良した方法では、RNA 抽出方法で核酸沈殿をエタチンメイトで行い、RT-PCR の試薬 (Promega #A3500) 組成を最終濃度 (/ul) で MgCl<sub>2</sub>:2.5mM, dNTPs:0.4mM, AMV-RT:0.4U, RNasin:0.4U, primer:each 1pmol とした。42°C 1 時間で逆転写後、Taq polymerase 0.05U を加え、PCR を実施した。プロトコルは Saito, et al.: Microbiol. Immunol. 42, 439-446 (1998) に準拠し、94°C 1 分-45°C 2 分-60°C 4 分で 5 回増幅後、94°C-45°C-60°C を各 1 分ずつ 30 回繰り返す、72°C 5 分を追加する方法で、RT-PCR 1 回法とした。

## C 研究結果

標準法 Nested PCR で検出された検体は、改良法の 1 回の RT-PCR ですべて検出された。非特異増幅産物は、SM82/NV81 の系で出現したが、NV82/81 の系では認められなかった。1999 年 1

表 1 検出 SRSV のプライマー感度

年	月	標準法		改良法	検体
		36/35→82/81*	82/81*	82/81*	
1997	2	-	+	+	1
	12	+	+	+	5
1998	1	-	+	+	5
	2	-	+	+	5
	3	+	+	+	5
	8	-	-	-	36
1999	1	-	+	+	4
7 件		2	6	6	61

\*82/81 は NV, SM82/81 primer pairs

## D 考察

ノーウォーク様ウイルス属及びサッポロ様ウイルス属を主とする集団発生胃腸炎では、一般に糞便採取時点でウイルス量が大幅に減少していることが多い。また、Polymerase 領域上流域における核酸配列の変異の幅も大きいことから Nested PCR で対応してきたが、検査時間を要し、1 次増幅産物の相互汚染の危険があった。

今回の検査法の比較検討に際しては、試薬を大量に調製し、抽出条件の均一化を図った。核酸抽出手順と PCR 反応系内容について検討した結果、核酸抽出時の 0.6M CTAB 処理、PCR 反応での dNTPs 量の調整、増幅温度の変更で非特異増幅もかなり抑えられ、標準法の Nested PCR 成績と同等の成績を得た。食中毒検査に際しては、変異の少ない領域を選んで、その短い部分を短時間で増幅、検出できれば十分であると考えられる。今後はこの感度を維持しながら、増幅時間の短縮を検討したい。

A1 ウイルス性食中毒SRSV検査法のフローチャート

a1ニガタ.jbw

分担研究者 篠川旦

新潟県保健環境科学研究所ウイルス科長

PBS(-)で検体の乳剤を作成

↓

2 分間攪拌、2,000xg、15 分間冷却遠心、上清を採取、500  $\mu$ l を検体とする

↓

等量のフルオロカーボンで 2 分間攪拌

↓

2,000xg、15 分間冷却遠心、上清 400  $\mu$ l を採取

↓

24% PEG(#6000)、4M NaCl 200  $\mu$ l を加え、4-8 時間放置

↓

18,000xg、20 分間冷却遠心。沈渣を 50  $\mu$ l 蒸留水に再浮遊

↓

20mg/ml PK 4  $\mu$ l、

PK buffer ( 0.2M Tris, 25mM EDTA, 0.3M NaCl, 2%SDS, pH7.5) 50  $\mu$ l  
を加え 37°C 30 分間処理

↓

6% CTAB 40  $\mu$ l、4M NaCl 25  $\mu$ l を加え、56°C 30 分間処理

↓

フェノール・クロロフォルム 100  $\mu$ l を加え、2 分間よく攪拌

↓

18,000xg、20 分間冷却遠心、上清 120  $\mu$ l 採取

↓

クロロフォルム 100  $\mu$ l を加え、2 分間よく攪拌

↓

18,000xg、20 分間冷却遠心、上清 100  $\mu$ l 採取

↓

エタチンメイト(Wako)+エタノール 250  $\mu$ l でよく攪拌

↓

直ちに 18,000xg、20 分間冷却遠心。沈渣を乾燥

↓

Rnase free water 50  $\mu$ l に再浮遊。 RNA 原液とする。

分担研究者 篠川旦

新潟県保健環境科学研究所ウイルス科長

## 1 RT-PCR法

-----  
Nuclease free water 23.0  $\mu$ l

10x Reaction buffer 5.0

25mM MgCl<sub>2</sub> 5.0

10mM dNTPs 2.0

AMV RT enzyme(20U/ $\mu$ l) 1.0Rnasin(40U/ $\mu$ l) 0.5

Primer(+) 50pmol 1.0

Primer(+) 50pmol 1.0 (プライマーは、(+)側に複数設定している)

Primer(-) 50pmol 1.0

RNA sample 10.0  
-----42°C 1時間 逆転写反応後、0.5  $\mu$ l の taq polymerase を加える。

## 2 PCR法

-----  
1 1回 94°C 4分

2 5回 94°C 1分

45°C 2分

60°C 4分

3 30回 94°C 1分

45°C 1分

72°C 1分

4 1回 72°C 5分 以後 5°Cに保持  
-----

## 3 Nested PCR

必要に応じて、1  $\mu$ l の 1st PCR 産物について Nested PCRを行う。



C-1 各分担者所管地域のウイルス性食中毒・胃腸炎実態の解明  
調査票

1	報告者	篠川 旦 (分担研究者)
2	研究機関名	新潟県保健環境科学研究所
3	所属	ウイルス科
4	補職名	参事・ウイルス科長
5	〒	950-2144
6	所在地	新潟市曾和 314-1
7	電話	025-263-9414
8	F A X	025-263-9410
9	e-mail	
10	検体の種類	糞便
11	検体採取	19980308
12	由来	食中毒
13	発生	新潟県
14	発生状況	集団
15	疾患状況	胃腸炎
16	潜伏時間	36hrs.
17	RT-PCR	promega RT-system #3500, 1 <sup>st</sup> PCR
18	増幅部位	ORF1
19	センスプライマー	SM82
20	配列	5'-ccactatgatgcagatta-3'
21	アンチセンス	NV81
22	配列	5'-acaatctcatcaccata-3'
23	遺伝子配列	<pre>ccactatgatgcagattactctcgctgggactccacgcagcagcgggcagtgttggcagcagcacttgaat catggtgaggttctctgctgaaccacaactagcacaatagtagctgaagacctgctagcaccaagtgtggt tgatgtgggtgacttcaaaatcaccattaatgaaggcctaccttctggtgtgccttgccacctcacagtggaact ccattgccactgggtgcttactttgtgtgcctttctgaagtgacaggactaggccccgacatcatacaagcta attccatgtactctttctatggtgatgatgagattgta</pre>
24	遺伝子バンク登録	無
25	アクション番号	
26	公開可否	可
27	条件	協議のうえ
28	特記	niigata-98-975



C-2 各分担者所管地域のウイルス性食中毒・胃腸炎実態の解明  
調査票

1	報告者	篠川 旦 (分担研究者)
2	研究機関名	新潟県保健環境科学研究所
3	所属	ウイルス科
4	補職名	参事・ウイルス科長
5	〒	950-2144
6	所在地	新潟市曾和 314-1
7	電話	025-263-9414
8	F A X	025-263-9410
9	e-mail	
10	検体の種類	糞便
11	検体採取	19970206
12	由来	食中毒
13	発生	新潟県
14	発生状況	集団
15	疾患状況	胃腸炎
16	潜伏時間	36hrs.
17	RT-PCR	promega RT-system #3500, 1 <sup>st</sup> PCR
18	増幅部位	ORF1
19	センスプライマー	SM82
20	配列	5'-ccactatgatgcagatta-3'
21	アンチセンス	NV81
22	配列	5'-acaatctcatcatcaccata-3'
23	遺伝子配列	 ccactatgatgcagattactctagatgggattcaaccagcaaaggagcattctttctgccgctatggagg tgatggtgcggttctctgctgaaccagaattggcacaagtggctgcagaggacctttggcacctagccagct agatgttggcgattttgtcatctcagttcaggagggcttgccatcaggagtcccatgtacatcacaatggaatt caatagcacactggattctaactctgagcgcaatggcagaagtatcaggctctcaccagatggtgttcaagc ccactctgtttttcattttatggtgatgatgagattgta
24	遺伝子バンク登録	無
25	アクション番号	
26	公開可否	可
27	条件	協議のうえ
28	特記	niigata-97-16

分担研究者 篠川 旦

新潟県保健環境科学研究所ウイルス科長

## 1 地方衛生研究所ウイルス性食中毒対策対応状況

- ・ 機関名 新潟県保健環境科学研究所
- ・ 担当部門 ウイルス科
- ・ マンパワー 研究職 5 名
- ・ 予算 行政依頼検査費 随時令達方式 約 50 万円  
研究費 50 万円

## 各自治体の SRSV 行政検査費概算／検体

- ・ 検査量 年間 10 事例 検査数 200 件(1997 年度実績)
- ・ 検査費 電頭 EM 700 円／件  
IEM / 件  
RT-PCR 4,400 円／件  
確認検査 15,000 円／件 (但し事例の代表株)
- ・ 季節対応状況 (四季比率／全体 100 対比%)  
春 夏 秋 冬  
割合 10 20 0 70  
(夏は、主に予防対策事業の食品検査を実施)

2 衛生行政主管部局との業務協定・定義等の協議 有  
(衛研の位置づけ)

病因物質にウイルスが疑われる場合の原因究明検査は、当所が行う。

## 3 検査と研究等比率状況

依頼検査 0 %、 行政検査 60 % 研究 40 %

## 4 依頼・行政検査の外部委託等の可否と理由について伺います。

- 否 : (理由) 営業者の依頼検査は、本来外部で行うべきである。  
しかし、検査実施機関が県内にないのが実状である。  
行政検査は、個人(企業)情報の保護の面から外部委託はできないと考えている。

# ドットハイブリダイゼーション法による SRSV 遺伝子の迅速確認法

分担研究者 関根 大正 東京都立衛生研究所ウイルス研究科科長

**研究要旨** 1997年12月から1998年11月までに東京都において RT-PCR 法で検出された SRSV 遺伝子を検討した結果、大部分がトロント類似株であった。現在の方法は有効であったが、多くの種類の SRSV に対応するには、PCR 検査、ハイブリ、塩基配列解析を多面的に活用する必要がある。

## A. 研究目的

現在、SRSV の検査法には RT-PCR 法が用いられているが、増幅産物のサイズを電気泳動法で判断するだけでは SRSV であるかどうか不確実であるので、検出した遺伝子の検討が必要である。東京都において食中毒事件及び有症苦情事例から検出された SRSV 遺伝子を、既知 SRSV 株とのドットハイブリダイゼーション法を実施して増幅産物の確認判定を行った。さらに、塩基配列解析を実施して、プライマーやプローブの改良を通じて、SRSV 検出法の迅速化と精度向上を図る。

## B. 研究方法

1997年12月から1998年11月までに東京都において RT-PCR 法で検出された SRSV 遺伝子を検討した。RNA 抽出は CTAB 法で行い、ポリメラーゼ領域の 2 段階 PCR 反応で検出した。プライマーは RT-1st 反応が NV35/36、2nd 反応は NV81/82 及び NV3/5 を用いた。2nd 産物の電気泳動で期待されたバンドが得られた場合、1st 産物と 2nd 産物のドットハイブリダイゼーションを行って、遺伝子の確認を行った。ドットハイブリダイゼーションのプローブは、組換えプラスミドの遺伝子から作成した。すなわち、トロント株類似の東京 94-1420 株と KY89 類似株の東京 94-1541 株の 2nd 産物をクローニングして、必要領域を切り出し、ランダムラベル法でフルオロセインを標識した。ハイブリの検出は化学発光で行った。

## C. 研究結果

1997年12月から1998年11月までの、東京都における食中毒事件及び有症苦情事例の SRSV 検査の結果、PCR 法では 111 事例中 81 事例が SRSV 陽性であった。このうち、カキが関連していた事例は 62 事例で陽性は 54 事例であった。表 1 は一事例あたり 4 件以上の検査を行った 100 事例についての、食品を除く便検査材料の結果のまとめであるが、便 1518 件中 766 件が RT-PCR 法で陽性となり、ハイブリダイゼーション法で 455 件、電子顕微鏡観察では 108 件陽性であった。電顕法で陽性にも拘らず PCR 法で陰性となった結果が数件あった。この時期の RT-PCR 検査法では不明瞭なバンドの出現が比較的多く、これらのケースもドットハイブリダイゼーション法で確認検査を実施した。ハイブリダイゼーション法で SRSV のタイプを分類した結果では、G1 が 27 件、G2 が 428 件であった。同一事例で G1 と G2 が混在した事例や、同一患者においても複数の SRSV が検出される場合もあった。15 事例について POL 領域の遺伝子解析を行った結果、トロント株類似が 10 事例、SMA 類似株が 2 事例、SOU 類似株が 1 事例、SMA 類似株と DSV 類似株の混

合事例が 1 事例、新株が 1 事例であった。ハイブリダイゼーション法による SRSV タイプ分類の結果と、塩基配列による SRSV 分類の結果は一致した。特に、PCR 法で明瞭なバンドを検出し、ハイブリダイゼーション法で強シグナルが得られた場合は、ほとんどがトロント類似株であった。新株の事例は PCR 法で明瞭なバンドが得られているのに、ハイブリダイゼーション法で陰性となった事例であった。また、SMA 類似株 3 件のハイブリダイゼーションは、それぞれ強シグナル、弱シグナル、陰性の結果となった。

## D. 考察

SRSV には多くの種類があることが報告されている。昨年の検査結果では、東京都で主に検出された SRSV はトロント類似株であった。現在、東京都ではハイブリダイゼーションのプローブとしてトロント類似株を使用しており、大部分の事例の検出が可能と考えられる。トロント類似株と KY89 類似株をプローブとしたドットハイブリダイゼーション法は簡便な SRSV 遺伝子確認法として有効であることが、今回の研究の結果明らかになった。しかし、PCR 法で明瞭なバンドが得られているのにハイブリダイゼーション法で陰性となった場合、SRSV のタイプが異なっている可能性がある。従って、プライマーやプローブの選択に当たっては、トロント類似株以外の事例の検出を考慮に入れた検出法の改良が必要で、現在、東京都で検出された SRSV の様々な株について遺伝子解析とプローブ作成を実施中である

## E. 結論

1. 東京都で検出された SRSV は大部分がトロント類似株であった。
2. 現段階では、多くの種類の SRSV に対応するには、PCR 検査のバンドパターンとハイブリパターンをもとに各事例の SRSV を迅速に分類し、トロント類似株以外のパターンの場合、迅速に塩基配列解析を実施して検査を進める必要があると考える。

## F. 学会発表

1. 1997年11月(横浜市) 第12回関東甲信静微生物協議会ウイルス部会
2. 1998年10月(熱海市) 第13回関東甲信静微生物協議会ウイルス部会
3. 日本食品微生物学会雑誌 1997年12月号
4. 東京都立衛生研究所年報 Vol.49(1998)

表1. 東京都のSRSSV検査の月別推移

	1997		1998										
	DEC	JAN	FEB	MAR	APR	MAY	JUN	JUL	AUG	SEP	OCT	NOV	
事例数	20	18	13	14	8	7	3	3	4	2	2	6	
検査数	261	214	187	277	160	92	17	51	55	25	35	79	
電子顕微鏡検査陽性数	24	36	11	14	7	9	0	5	0	2	0	0	
RT-PCR検査陽性数	166	144	115	177	55	34	1	14	1	8	0	51	
ハイブリッド数	122	116	68	64	22	13	0	2	0	3	0	45	
G1	15	2	0	3	5	2	0	0	0	0	0	0	
G2	107	114	68	61	17	11	0	2	0	3	0	45	

表2. 東京都のウイルス性食中毒及び有症苦情事例の月別推移  
 [ 事例数 ( ) 内はカキ関連事例数 ]

月	1997											
	OCT	NOV	DEC	JAN	FEB	MAR	APR	MAY	JUN	JUL	AUG	SEP
検査数	1	1	56(30)	41(25)	42(21)	27(4)	15	4	1	1	1	0
陽性数	1	1	30(18)	17(12)	22(16)	16(3)	8	1	1	1	0	0

月	1998											
	OCT	NOV	DEC	JAN	FEB	MAR	APR	MAY	JUN	JUL	AUG	SEP
検査数	3	2(1)	26(23)	26(21)	12(10)	13(3)	8	10(2)	3	3	5(1)	2
陽性数	2	0(0)	21(20)	22(19)	12(10)	9(3)	4	6(2)	0	2	0(0)	1

月	1998			1999		
	OCT	NOV	DEC	JAN	FEB	MAR
検査数	2(1)	6(1)	24(4)	16(4)		
陽性数	0(0)	4(0)	19(2)	8(3)		

図1. PCR法とハイブリダイゼーション法の比較

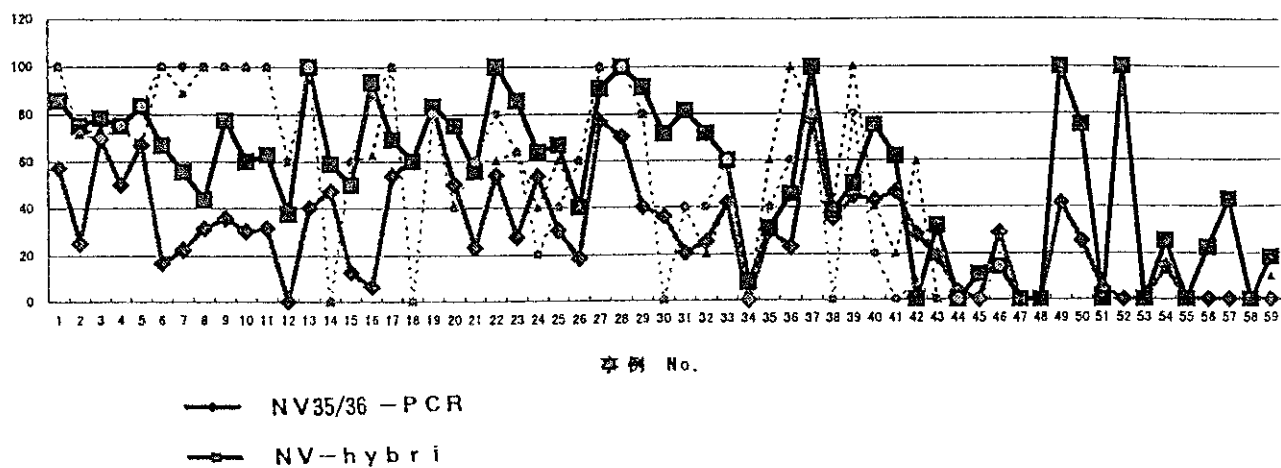
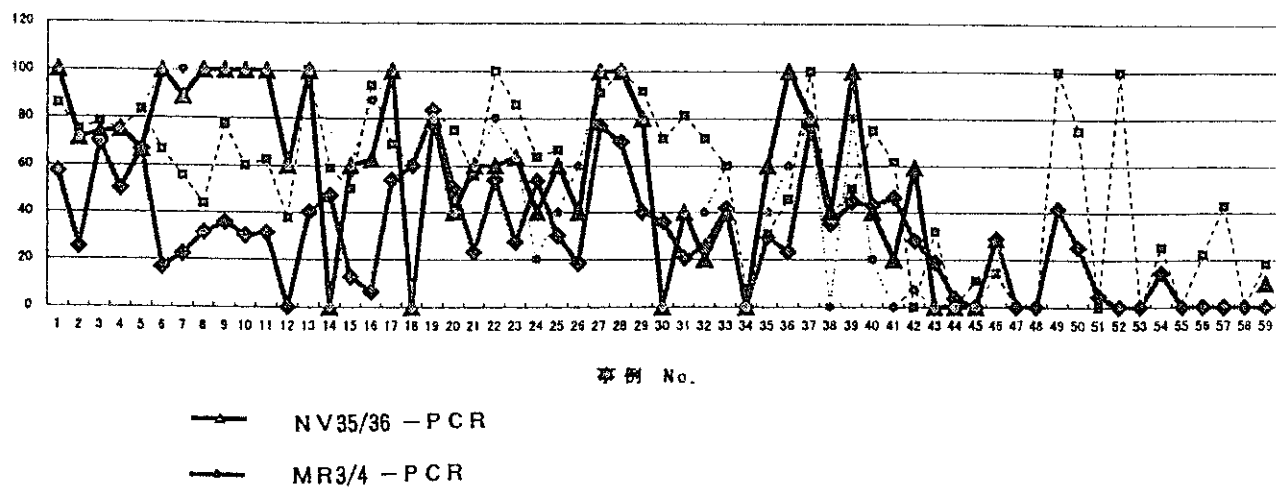


図2. プライマーの比較 (MR3/4 vs NV35/36)



## 分担研究報告書

### 横浜市における小型球形ウイルスの発生状況とその遺伝子解析

分担研究者 横浜市衛生研究所  
協力研究者

野口有三（検査研究課担当係長）  
宇宿秀三・宗村徹也

#### 研究要旨

1. 1998年10～12月に横浜市内で発生した食中毒様胃腸炎10事例(有症苦情, 照会事例を含む)について, RT-PCR法および電顕法で小型球形ウイルス(SRSV)を検索した結果, 糞便68件中28件が陽性であった。また, 食品では市販の生カキ20パック(生食用15パック, 加熱用5パック)についてRT-PCR法で検査したところ, 加熱用5パックからSRSV遺伝子が検出された。

2. また, 1998年1～3月に発生した食中毒様胃腸炎12事例24検体と上記の1事例2検体について, ポリメラーゼ領域の遺伝子解析を行った。その結果, 塩基配列の異なる少なくとも6種類のSRSVが存在していた。その6種類は, 1998年シーズンの前期5種類と後期1種類であり, 全てgenotypeⅡに属していた。しかし, 前期5種類は, 1株を除き全て2ないしは3塩基の違いが認められるだけであった。

#### A. 研究目的

横浜市内における食中毒様胃腸炎事例(有症苦情, 照会事例を含む)について, 小型球形ウイルス(SRSV)の発生状況を調査し, SRSV遺伝子の解析を行うことにより, 1998年の横浜市内における流行株を分子疫学的に解明することを目的とした。また, 感染源の食品として, 市販の生カキにおける本ウイルスの汚染状況を調査した。

#### B. 研究方法

検査材料は, 1998年1月から12月までの食中毒様胃腸炎患者の便材料を用い, 電顕法とRT-PCR法によるSRSV遺伝子の検出を行った(図1)。また, SRSV遺伝子の確認のできた検体についてPCR産物をダイレクトシーケンシングによる塩基配列の決定を行った。

なお, 使用したプライマーは, 1stPCR用には35/36, 2ndPCR用には, NV81/NV82, SM82のプライマーペアを用いた。

#### C. 研究結果

##### (1) 市内におけるSRSVの検出状況

1998年10～12月に横浜市内で発生した食中毒様胃腸炎10事例の糞便68件中28件が電顕法で陽性であった。RT-PCR法では, 8事例15件中3件でSRSV遺伝子が確認できたが, 1998年前期と比較して低い検出率となった。また, 食品では市販の生カキ20パック(生食用15パック, 加熱用5パック)についてRT-PCR法で検査したところ, 加熱用5パックからSRSV遺伝子が検出された。生食用と加熱用は産地の異なるものであった。

##### (2) SRSV遺伝子の解析

1998年1～3月の12事例24検体と1998年12月の1事例2検体について, ポリメラーゼ領域の遺伝子解析を行った。その結果, 塩基配列の異なる少なくとも6種類のSRSVが存在していた。その6種類は, 全てgenotypeⅡに属しており, 1998年シーズンの前期5種類, 後期1種類が存在し, 後者1種類は前者とかなり異なっていた。前期5種類は, 1種類を除き全て2～3塩基の違いが認められるだけであった(図2)。また, 前期12事例24件の内, 6事例16件は全て同一の塩基配列であった。

#### D. 考察

1998年前期においてはRT-PCR法で高率に検出されたが, 後期の検出率の低下は, 現行のプライマーペアだけでは対応できないことに起因していると考えられる。また, SRSV遺伝子の多様性は認められたものの, 前期においては1株が大きく異なっていた以外は, 2～3塩基程度の違いであった。このことは, 地域とシーズンによる主流株の存在が示唆された。

#### E. 結論

遺伝子解析を行い, 少なくとも6種類のSRSVが存在していた。1998年シーズンの前期における5種類は1株を除き全て2～3塩基の違いが認められるだけであった。また, 前期12事例24件の内, 6事例16件は全て同一の塩基配列であった。

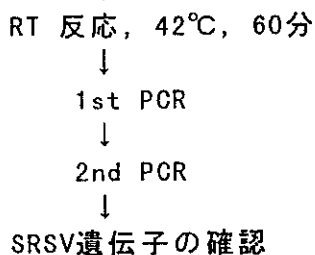
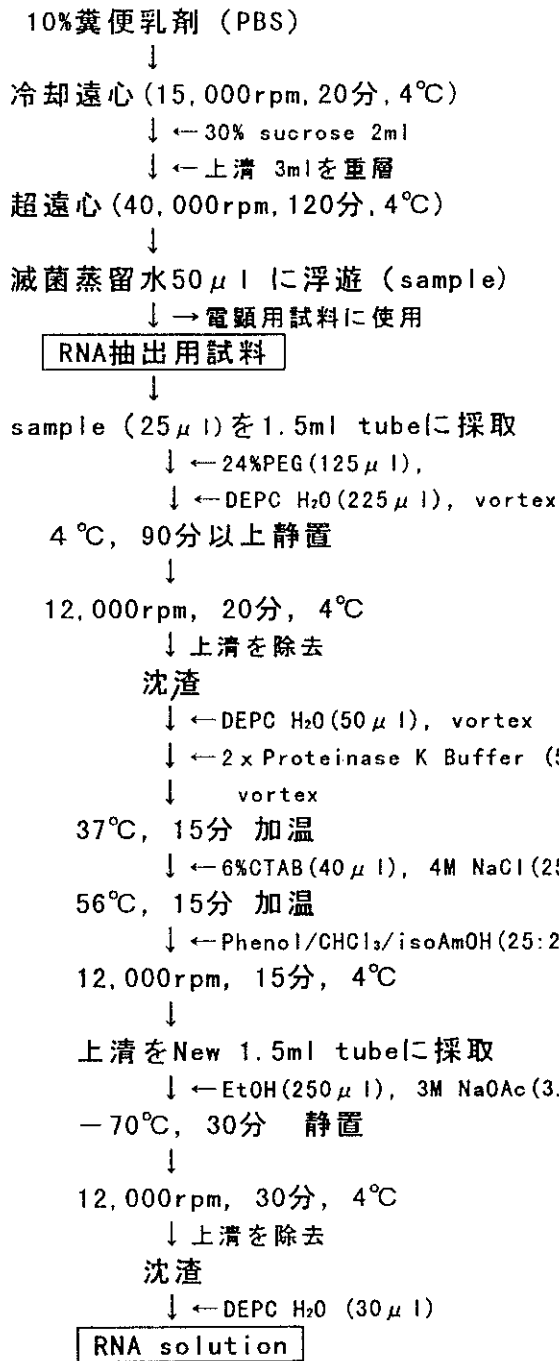
#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

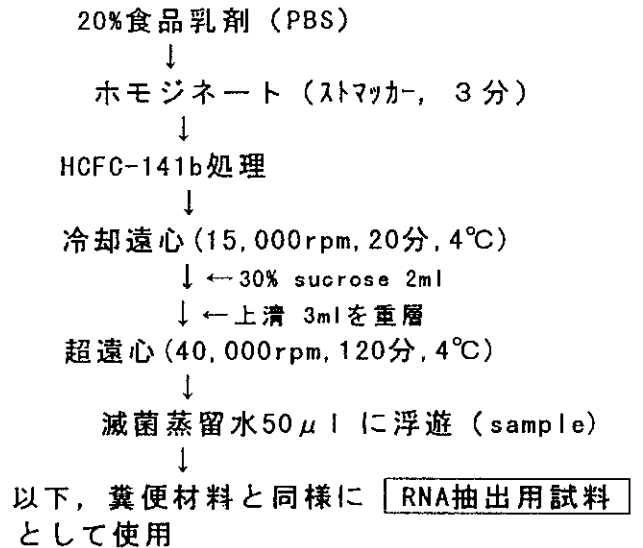
平成11年度横浜市衛生研究所年報に発表の予定

(1) フローチャート

1. 糞便材料



2. 食品材料



1st PCR, 2nd PCRの反応条件

94°C	3分間	1回	
94°C	1分間	} 40サイクル	
55°C	1分間		
72°C	1分間		
72°C	15分間	1回	

1st PCR用プライマー (35/36)  
2nd PCR用プライマー (NV81, NV82, SM82)

図1. 横浜におけるSRSV検査法のフローチャート





## 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 杉枝正明 静岡県環境衛生科学研究所

**研究要旨：**貝類に関与しないSRSVの感染源、感染経路を明らかにするために、と畜場に搬入された肥育ブタ（健康ブタ）の盲腸内容物を調査した。その結果、1,605 検体中 5検体(0.3%)からGenogroup IIに属するSRSV遺伝子が検出された。

また、SRSV食中毒事例の患者および調理従事者の糞便を経時的に採取し、SRSV遺伝子の検出を調査したところ、患者は発症後3週間、調理従事者では2週間まで排泄が確認された。

#### A. 研究目的

これまで食品を介してのウイルス感染として、生カキなどを摂食して発生した事例が数多く報告され、原因食品および推定食品を調査し、患者から検出されたSRSV遺伝子を解析することにより感染源、感染経路の原因究明が一部なされてきている。

しかし、貝類に関与しないSRSV事例も認められることから、その感染源、感染経路の詳細を把握することはSRSV食中毒を防止する上で重要である。

そこで、今回、と畜場に搬入され解体される肥育ブタ、和牛、ブロイラーおよび人生活環境下で愛玩用として飼育されている犬および猫を対象としてSRSV遺伝子の検出を試みると共に、SRSV食中毒事例の患者および調理従事者の糞便を経時的に採取し排泄状況を調査した。

#### B. 研究方法

肥育ブタは、1997年2月～12月の期間に静岡県内および愛知県の養豚農場で約6カ月間飼育され、と畜場に搬入された健康ブタの盲腸内容物1,605 検体を供試した。和牛、ブロイラーおよび人生活環境下で愛玩用として飼育されている犬および猫の糞便は、1997年2月に糞便採取した。

SRSV遺伝子の排泄期間の消長は、1998年2月県内の食堂で会席料理（カキグラタン、カニマヨネーズあえ、ホタテ・エビ・白身魚スモークなど、全て加熱調理済み）を喫食し、発症した食中毒事例で、協力の得られた患者6名から、発症後2,7,14,21～24日目に採便すると共に調理従事者2名からも同様に糞便を採取した。

各試料は糞便の電頭試料作製方法の前処理に準じて検体を濃縮後、RNA抽出方法はJiangらが報告したCTAB法を用いた。

RT-PCR法によるSRSV遺伝子の検出にはRNAポリメラーゼ領域を増幅する35/36 (Wangら1st, 470bp)、NV81/NV82:SM82 (Hayashiら、Nested, 330bp)のプライマーを用いた。また、Nested PCRで検出された産物の一部をTベクターに組み込んで、ポリメラーゼ領域の4561-4852 (292bp)の塩基配列を決定した。

#### C. D. 研究結果及び考察

1997年2月～12月の期間に、静岡県内および愛知県の養豚農場で約6カ月間飼育され、と畜場に搬入された肥育ブタ（健康ブタ）の盲腸内容物を調査したところ、1,605 検体中 5検体(0.3%)からSRSV遺伝子が検出された。農場別では、毎月、1農場で多頭飼育されている20～25頭を対象とし、69農場を調査し、5農場(7%)で飼育されていた肥育ブタから検出された。検出された5株のPCR産物について、Norwalk-Like Virus(NLV)遺伝子の4561-4852の塩基配列を決定したところ、5例はNLV遺伝子と58-60%、Snow Mountain Agent(SMV)と71-73%の類似性を示し、これまでに静岡県内で発生したヒト急性胃腸炎患者由来のNLV遺伝子とは60-72%のホモロジーで、検出された株間の塩基配列では92%、またアミノ酸配列では99%と高く、ブタ由来のNLVはヒトNLVのGenogroup IIに位置し、ヒト以外の新たな感染動物、感染経路として注目していく必要が示唆された。

また、1997年2月にと畜場に搬入された和牛(50頭)、ブロイラー(50羽)および愛玩用として飼育されている犬(56頭)、猫(40頭)の糞便を調査したが、SRSV遺伝子は検出されなかった。

SRSV遺伝子の排泄期間を調べるために、患者4例から発病後2,7,14,21,24～26日目の糞便中のSRSV遺伝子を検査したところ、2,7,14日目では4/4例、21日目では1/4例からSRSV遺伝子が検出され、24～26日目には全例から検出されなかった。

また、調理従事者2名は発症しておらずSRSVの感染時期は明らかでないが、調理従事者1名からSRSV遺伝子が14日目まで検出された。

SRSVに感染して発症した多くの患者は3～5日後に水様性下痢などの臨床症状が早期に回復し、予後がよいことから、長期間、経時的に患者糞便を対象としてSRSV検索を実施した報告例は少ない。

今回、SRSV食中毒事例で患者と調理従事者の糞便におけるSRSV遺伝子の排

出期間を調査し、患者 4例で発症後、3週も S R S V 遺伝子が検出されていることを確認した。患者糞便中の S R S V 遺伝子は、1st PCR法により発病初期 7日まで確認され、以後、21日目までは患者・調理従事者共に、Nested PCR法で検出された。

従って、日数経過と共に S R S V 量は減少していくが、人から人、人から食品などの感染源となる可能性が考えられる。

#### E. 論文

Detection of Norwalk virus in the caecum contents of pigs. Archives of Virology 143:1215-1221

#### F. 研究発表

第45回日本ウイルス学会総会（京都）1997  
第19回衛生微生物技術協議会（平成10年度）  
千葉

## 非細菌性食中毒におけるアイチウイルスと小型球形ウイルスの関与の研究

山下照夫\*、小林慎一、栄 賢司、鈴木康元 愛知県衛生研究所ウイルス部  
\*：分担研究者

### 研究要旨

非細菌性食中毒の病原因子の検査にアイチウイルス (AiV) と小型球形ウイルス (NLVs) 検出用 RT-PCR 法を導入し比較した。1997-98 年に発生した 15 事例中 AiV 陽性が 5 事例 (33%) で NLVs は全事例において検出された。陽性事例の検出率は AiV が 41% (12/29) で、NLVs は 69% (57/83) であった。AiV は生カキが原因と推定された事例でのみ検出され、NLVs と同時に検出された患者が 12 名中 7 名存在した。

### A、研究目的

非細菌性食中毒の病原因子の検査に AiV と NLVs の RT-PCR 法を導入し、その関与の程度を比較する。

### B、研究方法

平成 9 年 1 月から平成 10 年 12 月までの 2 年間に愛知県 (名古屋市は除く) で発生した食中毒事例のうち、病原細菌の検出されなかった 15 事例について RT-PCR 法によるウイルス検査を行った。9 事例はカキが原因食品と推定された。患者糞便の 10% 乳剤の遠心上清から Trizol (GIBCO BRL) を用いて RNA を抽出した。cDNA は oligo (dT)15 (Promega) およびランダムプライマー (タカラ) と M-MLV-RT (GIBCO BRL) を用いて作成した。PCR 法は AiV では 3C と 3D の結合部位付近の 226bp を増幅するプライマー C94B (5'-GACTTCCCCGGAGTCGTCGTCT) と 264K (5'-GACATCOGGTTGACGT TGAC) を設計した。NLVs では国立感染症研究所の武田先生の設計による

構造タンパク領域 (ORF2) の 5' 末端約 314bp を増幅するプライマー (Gi/G2) をもちいた。また、事例 1 から 6 の検体については、Dr. Estes の設計による 3D 領域の 470bp を増幅するプライマー (35/36) も併用した。PCR 反応は、Taq DNA polymerase (Boehringer) を加えた液で 94℃30 秒、55℃30 秒、72℃1 分 (GeneAmp PCR system 9600) を 30 サイクル (NLVs は nested-PCR) 行った後、反応液をアガロースゲル内で泳働した。AiV 遺伝子の確認はビオチンラベルプローブ AiPrb2 (5'-Biotin-ACCTTCGAAGGTCTGTGCGG) を作成してサザンプロットハイブリダイゼーションで行った。NLVs 遺伝子の確認は塩基配列を調べて行った。

### C、研究結果

1997-98 年に発生した 15 事例中 AiV 陽性が 5 事例 (33%) で NLVs は全事例において検出された。陽性事例の検出率は AiV が 41% (12/29) で、NLVs