

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

はじめに

本研究班の目標は、第1にウイルス性食中毒の国内実態の疫学的計量把握し、第2にそれら原因究明対策に必要なウイルス遺伝子診断技術開発とGLP化をめざし、第3に食中毒対策のための行政対応整備に関する提案を行い、第4に国内外海養殖産物のウイルス汚染とその原因につながると推定される環境水系のウイルス生態学的断面調査・リスク評価を試み、最後にウイルス環境生態学的制御に関する研究方向を模索することにある。平成3年(1991年)に、私たちは今日的「ウイルス性食中毒」の対策研究の緊急必要性に鑑み、社会的認識と食品衛生行政対応を求め日本国内を網羅した広域連携研究の組織化と推進を行い今日に至った。これまで、研究班にはウイルス学、分子生物学、都市工学、疫学、臨床医学などの広い専門分野の研究者を結集し、平成10年度(1998年)までに前述の第2～3の目標ステージまで確実に研究成果を上げ研究報告と提言を行ってきた。

なかでも、平成5年(1993年)にはウイルス胃腸炎集団発生と非細菌性食中毒の詳細に関する国内実態とその疫学を考察するに足る信頼データが国内には皆無であったことから、「食品媒介ウイルス性胃腸炎集団発生実態調査研究班」を設立し、独自の全国調査を実施しウイルス性食中毒関係の食品種、調理施設、各種検査、検出病原体など疫学要因の有用データ収集と解析評価を行い成果を公開した。この種の全国広域研究は内外に類なく専門研究者と行政の一体となった初の食品媒介ウイルス性胃腸炎集団発生実態調査が完成した。日本の「ウイルス性食中毒」実態成果を内外学会にも報告したことから、国外研究者や他国行政当局からも強い関心が寄せられた。その後、私たちは食中毒原因の主となった小型球形ウイルス(SRSV: Small Round Structured Virus)を迅速かつ効率的な診断検査法の確立と安全な食品食材供給、ウイルス汚染による直接健康被害の低減とさらには阻止をめざした行政対応等整備に関する総合研究をめざし研究展開してきた。

私たちの「食品媒介ウイルス性胃腸炎集団発生実態調査」成果を受け、食品衛生調査会にウイルス性食中毒対策部会が発足し、食中毒原因物質としてウイルスを含めることを厚生省に平成9年3月諮問した。平成9年5月30日、食品衛生法が改正され、国内で正規にウイルス性食中毒SRSV検査が導入されることになった。

国外では、米・英・カナダ・オランダ・オーストラリア・ニュージーランドなど先進諸国でのSRSVの疫学研究も近年とみに盛んとなり、諸国の食品衛生対応もわが国の様な行政法的な食品安全基準を設け明確化を行う方向にあるようである。

先駆的かつ総合的視野にたち独創的な研究戦略と展開ができた私たちの研究班はまさに初のケースでありました。この研究に全国の研究者が結集し継続的かつ精力的なご尽力を頂くことで、班長の大任をも務めさせて頂きましたことに感謝申し上げます。また、本事業最終年度として全国の衛生行政関係各位のご理解とご協力に深謝いたします。

平成12年4月吉日

主任研究者：川本 粂 義  
厚生省厚生科学特別研究事業  
厚生科学全国ウイルス性食中毒研究班長

# 平成11年度厚生科学特別研究事業報告

総括研究報告

分担研究報告集

研究班資料

研究班史

研究班組織

学会報告抄録集

# 厚生科学特別研究事業研究方針

## 研究展開

### 1 ウイルス性食中毒遺伝子検査法開発（平成9～10年度）

本班では、ウイルス性食中毒遺伝子検査法を簡便迅速かつ効率的検査法へ改良開発し、国内外に普及する。

### 2 輸入食品のウイルス学的安全試験（平成10～11年度）

輸入自由化と輸入需要量増加に伴う輸入食品食材の安全性について生鮮魚介類のウイルス蓄積汚染調査を実施し、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行政に資するべく検討する。

### 3 ウイルス性食中毒疫学（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検討する。

### 4 食品衛生行政への対応整備の提案（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」の原因究明と事件等発生低減と防止対策に向け、国民への食品の安全供給と監視のあり方を検討し、平常時・緊急時行政施策に向けた提言を行う。

### 5 環境水系のウイルス生態とその対策展望（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・耐アルカリの強い小型球形のエンベロープを持たない裸のssRNAウイルス（ヒトカリシウイルス）である。ただ、SRSV感染で未だ死亡例は出していない。感染源（ヒト）から排泄されたSRSVは下水処理、または個別家庭から簡易浄化を経て河川や海洋に至り繁殖「かき」などにウイルス蓄積を引き起こすと考えられる。しかし、環境水系SRSV生態を説明できるデータがこれまでなかったことから、本班では環境水からのウイルス検査法開発と応用、リスク評価に向けた検討を行う。

# 総括研究報告

# 平成 11 年度厚生科学特別研究事業総括報告

主任研究者 川本 粂義

協力研究者 神山 恵理奈、林菜穂子、葛口 剛  
岐阜県生物産業技術研究所

## 1 環境水系 SRSV 生態調査実施意義

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・耐アルカリの強い小型球形のエンベロープを持たない裸の ssRNA ウイルス（ヒトカリシウイルス）である。ただ、SRSV 感染で未だ死亡例は出していない。感染源（ヒト）から排泄された SRSV は下水処理、または個別家庭から簡易浄化を経て河川や海洋に至り養殖「かき」などにウイルス蓄積を引き起こすと考えられる。

しかし、環境水系の SRSV 動態を環境生態学的に明確に説明できるデータも報告もこれまで内外で得られていない。そこで、本年度、本班では本邦初の国内縦断による環境水系ウイルス生態調査を組織的に分子疫学レベルで実施した。

## 2 環境水系試料からのウイルス濃縮精製抽出、ウイルス遺伝子検出法開発

SRSV 検査技術開発とその応用、リスク評価に向けた検討も行った。汚水等環境水中からの SRSV 濃縮、精製、抽出とウイルス遺伝子検出法開発基礎は、これまでの研究確立した GLP に従った。検出のための最少原水量は、50 ml または 100 ml を基準とした。汚水等試料原水は遠心分離し、直ちに PEG/NaCl 凝集沈殿法を先行すると当然デブリが多くペレットに残るが、少量純水に再溶解し、ミリポア（0.22 ミクロン/ポアサイズ）濾過するか蔗糖 30% クッションに重層しを 10 万 G を超える条件で 1 時間程度超遠心する。RNA の効率的抽出と cDNA への逆転写効率の向上、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はこれまでの班 GLP を活用した。

## 3 SRSV 遺伝子解析比較

国内環境水系およびヒト・食品由来 SRSV 検出遺伝子の配列解析により動態を解析する。

## 4 新プライマーの検出効率評価

行政的見知からは SRSV 検出に群型決定の必要はなく、食中毒原因推定がウイルス性食中毒か否かの判別が先ず急ぎ必要であり、より広く SRSV 検出できるユニバーサルプライマーが求められる。従って、RT-PCR に採用される検出プライマーの国内 SRSV 遺伝子との適合相似性の検討が必要で新プライマー配列設計の良否が全国班員により検討された。

○ 新プライマー配列は、現在学術論文として投稿中。

○ 遺伝子解析成果と新プライマーは第 11 回国際ウイルス学会に発表

# 研究成果概要

## 国内環境水系SRSV生態実態調査

### SRSVの水系出現状況

岐阜では予備調査を含め15か月間を調査した結果、全ての月で汚水原水からSRSVが検出された。処理越流水からは12月から2月までの冬季にのみSRSVが検出された。8月から実施した平成11年度厚生科学全国縦断環境水調査でも、北海道から沖縄までの地域全ての水系で毎月SRSVが確実に検出された。

従って、環境水にSRSV出現が認められた事実は、全ての季節でヒトを感染源とするヒト・ヒト感染のSRSV自然サイクルの存在が証明されたことになる。

一般河川水からのウイルス制御は現在は不可能だが、下水処理においては効果があることが証明された。調査対象地方の下水処理施設は合流式か分流式かの何れかに分けられるが、何れの施設でも越流水（処理水）のウイルス検出陽性率が極端に低下することが判明した。

### ウイルス性食中毒・ウイルス性胃腸炎との関連・分別

ヒト由来SRSV検出は、冬季の食中毒事例と感染性胃腸炎流行が主体であったが、無症状者からのウイルス検出は疾病関連ではないので殆ど検査はなされていないので、SRSV無症感染者から感受性者へのウイルス伝播の実証はできない。

ただ、今回の調査でSRSVは確実に日本全地域に侵淫定着していることが分かった。そこで、可能性をもって考えられたこととしては、SRSV感染は無症状感染が圧倒的に多いのではないかと推定された。SRSV関連のウイルス性胃腸炎流行は、冬季乳幼児胃腸炎流行期にロタウイルス関連流行に先駆けSRSV関連流行が先行する現象を岐阜県感染サーベイランスで観察経験してきたが、沖縄を除く国内の愛媛県等他都道府県でも同様の傾向が認められる。

同様にウイルス性食中毒も冬季に集中しているが、これらの原因食品は圧倒的に主体をなしているものは依然「生かき」と推定され、「かき」そのものからのSRSV検出が相次いでいる。ただ「かき」は特定生産地からの輸送持ち込みであり人工的な地域ウイルス導入とみることが出来る。「かき」摂食患者からのヒト・ヒト感染で食中毒1事件が施設内流行以外に広域的ウイルス流行へ発展した事例は殆どないことから、自然ウイルス感染流行とウイルス性食中毒のそれぞれのSRSVを鑑別する必要があるとも考える。即ち、地域内侵淫浸透ウイルスと持ち込みウイルスとはモノが違うという考え方が生まれる。「かき」由来のモノは生産県地域特性型のモノであり、ウイルス性胃腸炎流行は地域定着型のモノではとの見方でSRSV流行や地域生息生態を分子疫学的に考察する必要がある。今後、ヒトや食品・環境水系のウイルス遺伝子多様性とその由来解析が今後の宿題として残される。

### 輸入食品のウイルス保有蓄積と安全性について

平成10～11年度の2年間、国立公衆衛生院衛生微生物学部西尾浩室長により輸入食品のウイルス蓄積汚染調査を研究班分担研究として実施した。この調査成果は、分担研究者報告に詳述されているので参照されたいが、SRSVのみならずHAV等他種ウイルス汚染も併せて調査して頂いた。これら調査対象と数量は、諸々の制約や制限の中での困難な断面調査でしかないし、輸出相手国からの輸入量からすれば遥か少数例調査でしかない。しかし、この調査成果は国民に供給される筈の輸入生鮮食品のウイルス蓄積とその持ち込みの現状を如実に現したものと恐らく初めての報告となるに違いない。研究班長として私は、大蔵省・通産省・農林水産省等の貿易および生産、生活統計などから次の推計数量を試算した。私たち国民は、「かき」消費量として年間平均約33万トン（牡蠣殻換算）を消費している。しかし、国内生産量は23万トン程度と推計され10万トン余りが輸入などに依存している。「かき」ですらこのような膨大な数量のものが国外から入ってくるのだから、検疫所としても食品衛生法によるウイルスについて食品安全性試験を現在にもまして実施すべきであろうと考える。

# Viral RNA Extraction and RT-PCR for SRSVs(NLVs,HuCLVs) from Stool, Food, and Drinking or Waste Water.

Feces, Food (Oyster's Intestinal Gland or Homoginated Food)

10 ~ 20 % suspension with PBS(-) or Sterile Double Distilled Water (DDW)

Starting Volume (300  $\mu$  l)

Supernatant after centrifugation of 15,000 rpm 20 min 4  $^{\circ}$ C

Water Sample; Wast Water 50 ml, or Concentrates  
Coagulated with activated Cellulose and Coagulate  
Reagents to 1/500-1/1000 vol. from Drinking-, River-  
or Waste Water of 20-30 l

Filtration

Coagulation with 8% PEG #6000 and 0.4M NaCl (Final Conc.) ; Over Night at 4  $^{\circ}$ C

PPT after 15,000 rpm 20 min 4  $^{\circ}$ C

RESUSP with DDW of 50-100  $\mu$  l

SUP after 15,000 rpm 20 min 4  $^{\circ}$ C

RNA Extraction; Sepagene RV-R (Sanko Junyaku, Japan)  
Isogen-LS or GentLE (Nippon Gene, Japan)  
Precipitation of Viral RNA with 70% EtOH post Isopropanol Treatment

RNA Resusp with 10  $\mu$  l of RNase Free Water

RT-PCR without Nested PCR

RT-PCR; One tube reaction or two step reactions of transcription and PCR.  
The new universal primer designed from nucleic acids and amino acid sequence  
of RNA polymerase region (ORF-1) of 177 Japanese Strains by Our Nation-Wide  
Survey Project. It can be widely detectable and widely confirm genogroup typing.

Our universal primer sets originally designed were revealed at XIth International  
Congress of Virology (ICV) of Sydney, Australia in Aug. 9-13, 1999  
P3 (reverse)/P1(sense), P2(reverse)/P1 or Y1(sense)/Y2(reverse)  
See descriptions primer sequences on the notice by H. KAWAMOTO, Ph.D.

Conventional Primer Sets Using in Japan.

NLV #35/NLV#36, MR#3/#4, Yuri#52F/R for RT-PCR  
NLV#81/NL#82 or SM#82, Yuri#22F/R for Nested PCR

RT Reaction; 42-43C 60 min, or 30C 10min/42C 45 min by AMV.

PCR ; 35c/c (94C 1min, 52C 1min , 72C 2min) by Extaq.

For Cloning and/or Direct Sequencing



## P- set

Porality	Sequence	Tm	Oligo Calciater
P1 (Sense)	5' - gCT gAT TAC TCT SgS Tgg gA - 3'	57.5C	54C
P2 (Anti sense)	5' - ACA CAg AgT gAg SAR CCA gTg - 3'	59.8/57.8	56/54
P3 (Anti sense)	5' - gTR STC ACA ATY TCA TCA TC - 3'	53.4/49.3/51.3	50/46/48

PCR products: P1/P2 237 bp  
P1/P3 325 bp

## Y- set

Y1 (Sense)	5' - Tgg gAC TCA ACA CAR CAg Ag - 3'	57.5/55.4	54/52
Y2 (Anti sense)	5' - TCA gAM AgK gCA CAS AgA gT - 3'	57.5/53.4/55.4	54/50/52

PCR products: Y1/Y2 233 bp

### Notes;

- 1 Nuclear acid expression on the primers as followings; e.g. R=A+g, Y=C+T, K=g+T, M=A+C, S=C+g, and W=A+T as IUB/IUPAC.
- 2 To establish efficient RT-PCR system, we have designed the new universal primer sets from RNA polymerase encoding region of open reading frame (ORF)-1 on domestic 'strains' of one hundred seventy seven out of 7,000 SRSVs detected from 1989 to 1998 in all of Japan. The copyright of them belong to our nation-wide survey project of Japan.
- 3 If you wish use this primers, we permit to only apply in your study excepted bussiness using for a laboration or primer productions. But you must get my agreements to us by e-mail; LEE07543@nifty.ne.jp (Dr.Kawamoto; President of National wide survey project of SRSVs), or other e-mail: drkaw @prontomail.ne.jp. (Dr.Kawamoto), or by fax on the number +81-574-25-3804. We expect a collabolative study for you.

## 平成 11 年度研究実施要領

研究班名 厚生省厚生科学特別全国ウイルス性食中毒研究班  
研究体制 研究班組織 別記

### 研究方針概要

本研究班は、人の「食品による直接健康被害」と「食の安全」、「環境」を守るべく「ウイルス性食中毒」と「自然感染たるウイルス性胃腸炎」の患者診断や食品安全検査法確立とその応用普及を實踐し、全国食品衛生行政の対応整備について研究・検討を行う。また、ヒト（宿主・感染源）、病原体（ウイルス）、環境（食品・水）の疫学 3 要素の平時モニタリングと緊急時対応も範疇に研究対象とする。

### 研究内容

本年度研究では、下記（成果報告要領を含む）について研究し報告すること。

#### A SRSV・RT-PCR法の新汎用プライマー（設計済 5 種\*）の実証

\*平成 10 年度研究班解析評価検討会議にて各位に提案したもの  
平成 11 年度はもとより過去の事例サンプルにて検出効率を比較されたい。

（研究業務：地方衛生研究所・国立感染研・公衆衛生院分担研究者対象）

\*\*平成 10 年度厚生科学特別研究事業研究報告に記した研究班法と従来プライマー（#35/36 または MR3/4、NESTED NV81/SM82orNV82）と新設計プライマー（P-Y 系：P1/P2-P3、Y1/Y2）による検出効率比較

注 新プライマー配列（P・Y 系）は別記のとおりです。  
なお、各分担研究者は各所で業者に合成依頼調製しご使用下さい。  
このプライマー配列は現在、学術論文等にも投稿中で公表していません。従って、当面は研究班の中でのみご使用できることを限定します。ご使用も本研究関連の診断や検査のみと限定させていただきますが、研究班員各位に使用優先権（プライオリティー）が認められます。  
（この注は平成 11 年 7 月 29 日付 厚生科学岐阜 99 号の 9、厚生科学特別研究事業主任研究者川本尋義文発の実施要領第 2 版（一部改正）に記載し連絡した）

#### B 各分担者の関連地域内での環境水系の SRSV 動向の把握と解明

- ・下水道集中汚水、処理場越流水（浄化放流水）等ペア水採取（月 2 回）採取量は自己検体（1 リットル程度）、東大送付用（1 リットル程度）
- ・SRSV 遺伝子の検出：従来プライマーと新プライマーを使用\*\*  
上記検出ウイルス遺伝子配列決定解析：決定できない施設の分担研究者は PCR 産物を国立感染症研究所ウイルス 2 部宇田川先生あて送付  
（研究業務：地方衛生研究所分担研究者対象）

C 海洋産物（かき等）からのSRSV検出

- ・かき等輸入食品または国内養殖かき等からの採取検査  
（国立公衆衛生院分担研究者他 実施可能な班ブロック研究者\*\*\*）

\*\*\* 東北ブロック：秋田衛科研 分担研究者齋藤先生（センター）と  
協力研究者（三上、秋山先生）、中国ブロック：広島市衛研池田先生、  
愛媛衛研、大瀬戸先生

D ウイルス生態学と環境指標・リスク評価等相関解析  
（座長：東京大学大学院工学系研究科都市工学専攻・大垣眞一郎教授）

- ・東大大垣教授（片山助手）のもとへ、環境水試料送付を指定した分担研究者は担当採水検体を採取後、流入水（未処理下水）300ミリリットル、放流水500ミリリットル程度を宅配便要冷蔵にてご送付願います。  
この検体は月1回のみとします。従って、採取が月2回の場合、後半のもので第3週以降のものとなります。東大着予定が第3週後半から4週前半までに到着するよう採取時期をご選定の上ご決定下さいますようお願い申し上げます。

東大では大腸菌とファージ検出・解析が実施されます。

◎ 送付先

〒113-8656 東京都文京区本郷 7-3-1  
東京大学大学院工学系研究科都市工学専攻  
片山浩之 先生 宛  
TEL 03-5841-6245 FAX 03-5841-8533

シールではなくマジックで以下を必ずボトルに直接記載して下さい。

厚生科学特別研究事業：分担研究者氏名	△△△△△△
採取年月日：都市等名	□□□□□□
県名	○○○○○○

送付は、清浄広口ポリビン500ミリリットル用をご使用下さい。  
但し、ボトルの返却はいたしません。

E SRSV検出遺伝子塩基配列解析（座長：東京農大・大山教授）

- ・SRSV検出遺伝子配列報告収集（分担研究者全員対象）
- ・新プライマー（P・Y系）の検出効率評価
- ・総合遺伝子比較解析

F 食品・環境のウイルス汚染制御に向けた新研究提案

## 研究成果報告様式

- ・ 各分担研究者報告様式は前年の厚生科学研究事業様式に準じます。
- ・ 遺伝子解析情報は、昨年度の研究班様式（別紙）と同様です。
- ・ 各分担研究者が学会・論文等で成果発表される場合、主任研究者および関連分担研究者・研究協力者の併記に加え、末尾には「本研究（または一部）は厚生省厚生科学特別研究事業による」と記載下さい。  
なお、厚生科学特別研究事業の論文英記表記は次のとおりです。

Grant-in-Aid for Special Scientific Research 19△△, ministry of Health and Welfare, Japan

### ◎ 国内環境・食品からのSRSV検出遺伝子塩基配列解析

- ・ ウイルス性食中毒と胃腸炎関連のヒト検体、食品、環境試料等から検出されたSRSVシーケンス情報の統合ファイルを本班にて作成する。
- ・ データベースとしてリンクした全データは全分担研究者へ還元します。
- ・ データ調査票は様式に従い全てテキスト形式で作成してください。

見本は入力参考です。各分担研究者は打ち出しサンプルと共にフロッピー（FD）で送付提出して下さい。

### 調査票 入力記載要領

- 1 ファイル項目構成形式は全分担研究者の報告が共通として後のリンクが全て速やかにできる様、ファイル名称も統一をはかりたいと存じます。
- 2 遺伝子情報は必ず1件1ファイル単位としてご収録下さい。  
複数の場合は下記ファイル名のようにに番号を加えます。

例えば、シーケンスが5件の場合、独立した5個のファイルとして下さい。

\*\*\*SQ01.TXT ~ \*\*\*SQ05.TXT

## 遺伝子解析データ調査票 入力要領

この部分は入力しません。入力項目の名称参照です。

↓  
↓  
↓  
↓

項目該当にデータの無い場合は全てリターンキーを押し改行。  
この部分のみ順次入力し各項目ごと必ずリターンキーを押す。

- |              |   |                               |
|--------------|---|-------------------------------|
| 1 報告者        | 川本尋義 (主任・分担・協力研究者名)                                   |                               |
| 2 研究機関名      | 岐阜県生物産業技術研究所  |                               |
| 3 所属         | ■■■■部   |                               |
| 4 補職名        | 部長研究員   | この部分はお知らせ<br>など整理にも活用し<br>ます。 |
| 5 〒          | 505-0004  |                               |
| 6 所在地        | 岐阜県美濃加茂市蜂屋町上蜂屋 3481-2                                 |                               |
| 7 電話         | 0574-25-3803  |                               |
| 8 F A X      | 0574-25-3804  |                               |
| 9 e-mail     | 確実にメールを届けられるアドレス名称を記入                                 |                               |
|              |   |                               |
| 10 検体の種類     | 生かき (例) 「糞便、咽頭スワブ、吐物、生かき、野菜、給食、拭き取り、上水、下水、海水、その他」から選択 |                               |
| 11 検体採取      | 19980215 (例)  |                               |
| 12 由来        | 食中毒、感染症サーベイ、試買、監視、不明 からお選び下さい。                        |                               |
| 13 発生        | 三重県 (例) など摂食や産地が異なる場合も記載して下さい。                        |                               |
| 14 発生状況      | 集団、散発のいずれか。   |                               |
| 15 疾患状況      | 胃腸炎または無症状   | ←ヒトの場合のみ                      |
| 16 潜伏時間      | 38.5  | ←ヒトの場合のみ                      |
|              |   |                               |
| 17 RT-PCR    | コメント  | ←ご記入自由                        |
| 18 増幅部位      | ORF 1, 2, 3 または <u>特定エリア</u>                          |                               |
| 19 センプライマー   | 名称  |                               |
| 20           | 配列 小文字 agtc で記載                                       |                               |
| 21 アンチセンス    | 名称  |                               |
| 22           | 配列 小文字 agtc で記載                                       |                               |
| 23 遺伝子配列     | 小文字 agtc で記載、<br>200 ベースでも 500 ベースでも続け、最後にリターンキーを押す。  |                               |
| 24 遺伝子バンク登録  | 有または無   |                               |
| 25 アクセッション番号 | ZZZZZZZZZZ  |                               |
|              |   |                               |
| 26 公開可否      | 可または否   |                               |
| 27 条件        | 論文発表を完了後など  | ←ご記入自由                        |
| 28 特記        | メモ・コメントなど   | ←ご記入自由                        |

お送り頂く時、プリントアウト用紙も添付して下さい。

# 環境水からの SRSV 遺伝子検出法

環境水（下水、河川水、海水\*等）からのウイルス性胃腸炎・食中毒の病原体である小型球形ウイルス（SRSV, Small Round Structured Virus；カリシウイルス科ノロウイルス種 NV）の検出法

## 環境水系ウイルス遺伝子モニタリングシステム

### 《方法》

環境水を超遠心または PEG 沈により濃縮し、SepaGene RV-R を用いて RNA 抽出を行い、得られた RNA から RT-PCR, Nested PCR により SRSV 遺伝子 (RNA) を増幅し、アガロースゲル電気泳動で検出を行う。

\* 海水 PEG 沈では最終 0.4M への要塩濃度調整

- 環境水
- ↓ 粗遠心 (2,150×g, 4°C, 15min)
- 上清
- ↓ 超遠心 (100,000×g, 4°C, 120min) or PEG 沈 (16%PEG#6000, 0.8M NaCl を等量加え、4°C で一晚静置後、2,150×g, 4°C, 15min 遠心)
- 沈殿
- ↓ ←超純水 100 μl
- ウイルス濃縮サンプル 100 μl
- ↓ SepaGene RV-R により RNA 抽出
- RNA 10 μl
- ↓ RT-PCR & Nested PCR
- アガロースゲル電気泳動により PCR 産物を検出

### PCR 条件

#### RT-PCR

10×PCR Buffer	5.0		
2.5 mM dNTPs	4.4	43°C	60min
RNase inhibitor	0.3	95°C	5min
330 μM sense primer	0.25	94°C	1min
330 μM antisense primer	0.25	52°C	1min
Taq polymerase	0.25	72°C	1min
AMV Reverse Transcriptase	0.17	72°C	7min
RNA	5.0		
DDW	34.38		
Total	50 μl		

} 35 cycles

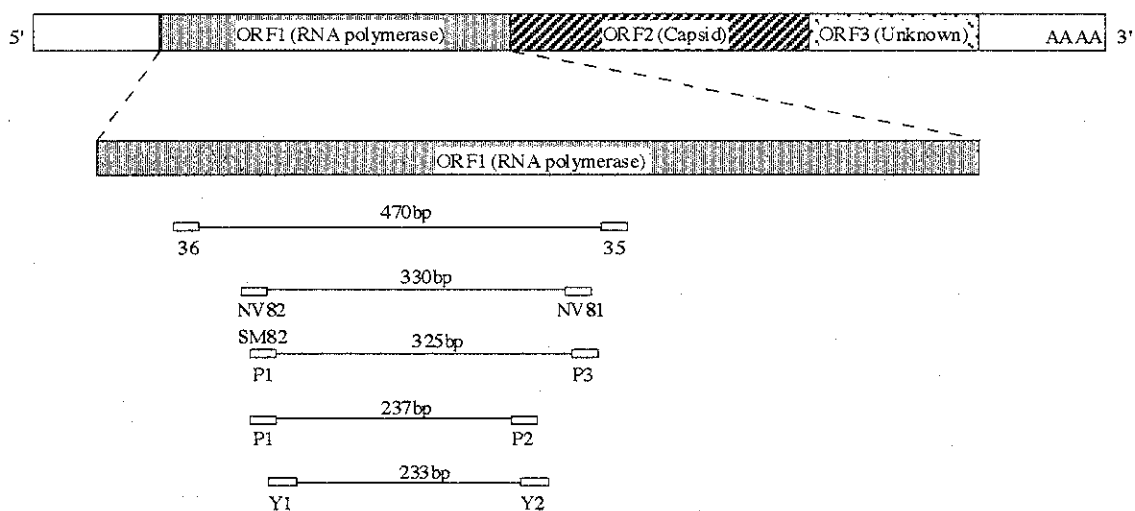
#### Nested PCR

10×PCR Buffer	5.0		
2.5 mM dNTPs	4.0	94°C	3min
330 μM sense primer	0.3	94°C	1min
330 μM antisense primer	0.3	52°C	1min
Taq polymerase	0.3	72°C	1min
RT-PCR product	1.0	72°C	7min
DDW	39.1		
Total	50 μl		

} 35 cycles

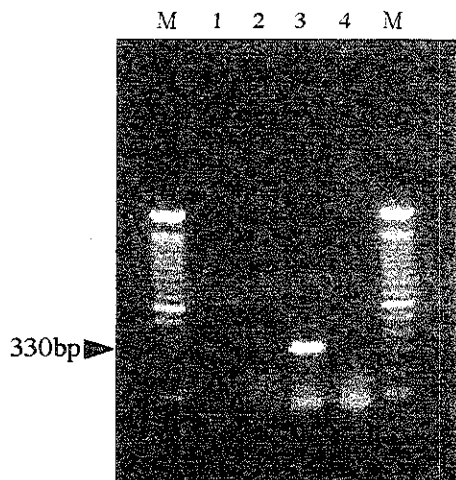
プライマーの配列

35	5'	CTT GTT GGT TTG AGG CCA TAT	3'	RT-PCR 用 antisense
36	5'	ATA AAA GTT GGC ATG AAC	3'	RT-PCR 用 sense
NV81	5'	ACA ATC TCA TCA TCA CCA TA	3'	Nested PCR 用 antisense
NV82	5'	TCA TTT TGA TGC AGA TTA	3'	Nested PCR 用 sense
SM82	5'	CCA CTA TGA TGC AGA TTA	3'	Nested PCR 用 sense
P1	5'	GCT GAT TAC TCT SGS TGG GA	3'	RT-PCR & Nested PCR 用 sense
P2	5'	ACA CAG AGT GAG SAR CCA GTG	3'	Nested PCR 用 antisense
P3	5'	GTR STC ACA ATY TCA TCA TC	3'	RT-PCR 用 antisense
Y1	5'	TGG GAC TCA ACA CAR CAG AG	3'	Nested PCR 用 sense
Y2	5'	TCA GAM AGK GCA CAS AGA GT	3'	Nested PCR 用 antisense



SRSVの遺伝子マップとRNA polymerase領域増幅用プライマー

《結果》



アガロースゲル電気泳動によるPCR産物の検出

- Lane1 : 下水処理場 流入水 RT-PCR産物
- Lane2 : 下水処理場 放流水 RT-PCR産物
- Lane3 : 下水処理場 流入水 Nested PCR産物
- Lane4 : 下水処理場 放流水 Nested PCR産物
- LaneM : 100bp DNA Ladder

使用プライマー : RT-PCR 35/36  
Nested PCR NV81/NV82/SM82

# 分担研究報告集



## 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 沢田春美

協力研究者 吉澄志磨 三好正浩（北海道立衛生研究所）

### 要旨

1. 平成11年2月～平成12年3月末までの14ヵ月間に北海道で発生した食中毒13事例について病原検索を行ない、カキ関連5事例、その他の5事例の計10事例の糞便検体からNLVを検出した。遺伝子型はIIB型が多かった。
2. 平成11年8月～平成12年2月、各月上、下旬の2回、札幌市の下水処理場（合流式）においてNLV検査を実施した。9月採取の最終沈殿池出水を除いて全期間のサンプルがNLV陽性であった。シーケンシングを行ったNLV15件の遺伝子型は全てII型であった。「せせらぎ用水」（処理水を更に高度処理したもの）のサンプルからは検出されなかった。
3. 北海道東部の2海域において、平成12年2月上旬に採取された養殖カキ100個についてNLV検査を行なったが結果は陰性であった。
4. 食中毒事例、下水処理場からのサンプル及び国立感染症研究所による糞便パネルについて、各種プライマー（MR3/4、P1/3、P1/2、Y1/2、NV82・SM82/NV81）を用いてNLVの検出状況を比較した。プライマーによる検出効率はウイルスの遺伝子型によって異なる傾向があり、I型に対してはNV82・SM82/NV81が良好であった。一方、II型ではサブタイプによって差異がみられるが、全体的にはP1/3が良好な成績を示した。糞便パネル中の陽性8検体はP系プライマーによってのみ全例が検出された。また、MR3/4による検出効率が最近に至り低下傾向にあることが示された。

### A. 目的

1. 北海道におけるウイルス性食中毒の発生状況ならびにNLVの関与を把握する。
2. 各種のNLV検索材料について数種のプライマーを用いてRT-PCRを実施し、NLVの検出効率を比較検討する。
3. 札幌市の、主として住宅、ビル排水が流入する下水処理場において処理用水を採取してNLVの検出を試み、本ウイルスによる生活排水の汚染状況を経時的に観察する。

### B. 材料及び方法

1. 食中毒事例における検査材料：平成11年2月～平成12年3月末までの14ヵ月間に北海道で発生した食中毒13事例より得られた患者糞便122件、患者吐物10件、調理従事者糞便20件、患者の接触者糞便9件、カキ2件、カキ以外の食品31件、井戸水1件（1ℓ）。
2. 下水処理場における検水：平成11年8月～平成12年2月に各月上、下旬の2回、札幌市の下水処理場において採取した流入水及び最終沈殿池出水、8月～11月採取の「せせらぎ用水」（砂ろ過及び塩素消毒による高度処理水）。各検体とも50 mlを使用。

3. プライマー検定用糞便検体：平成7年12月～平成12年1月までにみられた食中毒24事例の糞便検体から、当初のRT-PCR法及び電顕法の結果をもとに選定した36件及び国立感染症研究所による糞便パネル10件。プライマー調製、RTの日程など統一した実験条件のもとで実施。
4. カキの収去試験：平成12年2月上旬、北海道東部の2海域各10漁場において採取された養殖カキ100個。
5. NLV検査法：電顕法、RT-PCR法及びダイレクトシーケンシング法は従来通り実施。

### C. 結果

1. 食中毒事例からのNLV検出：上記期間、北海道11地区において13件の食中毒が発生した。そのうちカキ関連5事例は12月に集中してみられ、全例からNLVが検出された。社会福祉施設内発生などカキの関与しない事例8例中5例からもNLVが検出された。遺伝子型はIIBが多くみられたが、道央の2地区において型別不明のNLVが検出された。また、Yuri型に近いものも検出された。
2. 下水処理場における検水からのNLV検出：札幌市には9か所の下水処理場があり、約60%は合流式である。今回採水を行った施設も合流式で、処理区域は家庭やビルの多い都心部の一部である。

食品工場や飲食店の密集地は含まれていない。NLVは9月の最終沈殿池出水を除いて、流入水出水の両サンプルから毎月検出された。特に流入水は各月2回ともNLV陽性であった。プライマーはP1/3-Nested P1/2及びY1/2、MR3/4-Nested NV82・SM82/NN81の2組を用いたが、1サンプルを除いてP1/3系列による検出効率が良好であった。2月末現在、検出された22件中15件についてシーケンシングを行い、全例II型との結果を得ている。

3. プライマーによる検出効率の検定：1) 平成7年12月～平成12年1月の食中毒事例の患者糞便 遺伝子型別にプライマーの検出効率を比較すると I型NLVに対しては NV82・SM82/NN81 がその他のプライマーよりも良好な成績を示した。一方、II型についてみると、A～Dのサブグループによって差異はあるが、増幅バンドの強度の点でもP1/3、P1/2の検出効率が良好であった。ウイルスとの間に6塩基以上の相違のあるケースでは検出陽性例はみられなかった。検出状況を経時的にみると、従来より良好なプライマーとして北海道で多く用いてきたMR3/4の効率が最近に至り低下している傾向がみられた。また、電顕法によりNLV陽性であるにもかかわらず、用いた5種のプライマー

のいずれによっても検出されない例が数件みられた。2) 国立感染症研究所による糞便パネル このパネルは10件中8件がNLV陽性とされている。前項に示したプライマー及びNV36/35'による検定を行ったところ、8例全てが検出されたのはP1/3及びP1/2を用いたときであった。増幅バンドの強度、非特異的バンドの無いことなど、P1/3がより良好な成績を示した。

#### D. 考察

平成11年度においても冬季にカキが原因と思われる食中毒の発生が相次いで報告された。検出されたNLVの遺伝子型はIIBが多くみられたが、検定結果からも明らかのように、用いるプライマーによって検出率、遺伝子型が左右される可能性がある。ウイルス性食中毒の疫学的知見の蓄積のためにも複数プライマーの使用は必須であろう。冬季以外にもNLVによる食中毒がたびたびみられるが、下水処理場における本ウイルスの検出成績もこのことを反映するものであろう。3月～7月の検索は行っていないが、ほぼ年間を通してNLVが下水道へ排出されているものと思われる。今回サンプリングを行った処理場では下水の流入から最終沈殿池出水まで16時間ほど要するという。短時間で経時的に採水を行い分析する必要もあらわされた。

北海道においてNLVが検出された食中毒事例

事例No.	発生時期	発生地区・状況	検体*	NLV検出数	RT-PCR	電顕法	遺伝子型
1	平成11. 2	旭川市 飲食店 成人	糞便 (患者)	20/37	18/37	8/25	IIB
			(調理者)	2/6	2/6	0/3	
2	平成11. 6	倶知安町 養護老人ホーム	糞便 (患者)	1/2	1/2	1/2	IIB
			(職員)	0/2	0/2	0/2	
3	平成11. 6	岩見沢市 小学校	糞便 (患者)	1/4	1/4	1/4	IIB
4	平成11.12	札幌市 法事 成人 カキ	糞便 (患者)	2/5	1/5	2/5	IIB
			カキ	0/6	0/6	NT	
			カキグラタン	0/1	0/1	NT	
5	平成11.12	伊達市 飲食店 成人 カキ	糞便 (患者)	24/36	24/36	10/35	I & ?
			(調理者)	2/5	2/5	0/4	
			カキ	0/6	0/6	NT	
			調理食品残物	2/19**	2/19	NT	
			井戸水 (1ℓ)	0/1	0/1	NT	
6	平成11.12	滝川市 合宿研修 高校生・教師 ホタテ2品	糞便 (患者)	3/3	3/3	2/3	IIB
			(調理者)	0/3	0/3	0/3	
			ホタテ	0/2	0/2	NT	
7	平成11.12	厚田村 社会福祉施設 成人 カキ	糞便 (患者)	2/7	2/7	2/6	?
			(接触者)	1/8	1/8	1/8	
			カキ	0/1	0/1	NT	
8	平成11.12	恵庭市 飲食店 成人 カキ	糞便 (患者)	5/9	4/9	5/9	IIA & IIB
			(調理者)	0/3	0/3	0/3	
9	平成11.12	岩見沢市 飲食店 成人 カキ	糞便 (患者)	2/3	1/3	2/3	I
10	平成12. 3	早来町 社会福祉施設 成人	糞便 (患者)	4/7	4/7	3/7	IIC & Yuri型

\* 患者材料は糞便のみ表示した。

\*\* シークエンシングの結果、1件(タコ)は患者及び調理者の検体と遺伝子型が一致。  
他の1件(鶏肉)は2種類の型のmixtureと思われる。いずれも型別は未解析。

札幌市の下水道処理場における流入水、最終沈殿池出水  
及びせせらぎ用水からのNLVの検出

採水時期	平成11年				平成12年			
	8月 10日 24日	9月 9日 24日	10月 7日 19日	11月 4日 22日	12月 6日 20日	1月 12日 25日	2月 15日 29日	
検水								
流入水	(+) (+)	+ +	(+) (+)	(+) (+)	(+) (+)	(+) (+)	+ +	
最終沈殿池出水	- (+)	- -	+ (+)	+ -	(+) (+)	(+) -	+ +	
せせらぎ用水	- -	- -	- -	- -	NT	NT	NT	

(+) シークエンシングにより遺伝子型IIと判明