

A,B,Oのヒトに出現し、多くが感染する。GII/4は2002年以降ポリメラーゼ領域で、2年毎に変異が起っており(2002年型, 2004年, 2006年a, b型), 変異株が起きた年に大流行を起こしており(図2), この領域は増殖に関与する遺伝子で、増殖が旺盛になっているとも推測される。

最近, ウシ, ブタの糞便あるいは市販食肉からGII/4株を検出し, ブタ/ヒトまたはウシ/ヒトのノロウイルス間で遺伝子組替えが起こり, 親和性や病原性が変化したノロウイルス株が出現する可能性を報告しており¹¹⁾, 今後, 病原性の強い株の出現も予測される。

まとめ

今後も, ノロウイルスによる集団発生, 食中毒事件は多発することが予測されるが, その予防は手洗いと加熱, 感染源を消毒することである。

参 考 文 献

- 1) Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, *et al.* Visualization by immuno electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Virol* 1972; 10: 1075-81.
- 2) CDC. "Norwalk-like viruses". Public health consequences and outbreak management. *MMWR* 2001; 50(RR09): 1-18.
- 3) 西尾 治, 秋山美穂, 愛木智香子, 他. ノロウイルスによる食中毒について. *食品衛生学雑誌* 2005; 46: 235-45.
- 4) 西尾 治. ノロウイルス現場対策. 丸山務監修. ノロウイルスの知識と感染予防. 東京 幸書房 2006; P9-48.
- 5) Duizer E, Bijkerk P, De Groot A, *et al.* Inactivation of caliciviruses. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70: 4538-43.
- 6) Huston AM, Atmar RI, Graham DY, *et al.* Norwalk virus infection and disease is associated with ABO histo-blood group type. *J Infect Dis* 2002; 185: 1335-7.
- 7) Rockz HH, Venema H, Hoebe CJ, *et al.* Association of histo-blood antigens and susceptibility to norovirus infections. *J Infect Dis* 2005; 192: 749-54.
- 8) Siebenga JJ, Vennema H, Duizer E, *et al.* Gastroenteritis in the Netherlands, 1994-2005. *Emerging Infectious Diseases* 2007; 13: 144-6.
- 9) CDC. Norovirus Activity-United States, 2006-2007. *MMWR* 2007; 56: 842-6.
- 10) Mattison K, Shukla A, Cook A, *et al.* Human norovirus in swine and cattle. *Emerging Infectious Diseases* 2007; 13: 1184-8.
- 11) Straub TM, Bntrup KH, Orosz-Conghlan P. *In vitro* cell culture infectivity assay for human noroviruses. *Emerging Infectious Diseases* 2007; 13: 396-403.

【報文】

ノロウイルス代替のネコカリシウイルスおよび 各種微生物に有効なエタノール製剤の開発

隈下 祐一^{1*}, 加藤 由実², 高本 一夫¹,
古田 太郎¹, 西尾 治³, 木村 博一³

Development of an Ethanol Product Effective against Feline Calicivirus, a Norovirus Surrogate, and Various Microorganisms

Yuichi KUMASHITA^{1*}, Yumi KATO², Kazuo TAKAMOTO¹,
Taro FURUTA¹, Osamu NISHIO³, and Hirokazu KIMURA³

¹Biochemical Laboratory, Saraya Co., LTD. 24-12, Tamate-cho, Kashiwara-shi, Osaka 582-0028, Japan

²Sales Management Dept., Food Safety Dept., Inspection Sect., Tokyo Saraya Co., LTD.
1-25-8, Higashishinagawa, Shinagawa-ku, Tokyo 140-0002, Japan

³Infectious Diseases Surveillance Center, National Institute of Infectious Diseases.
4-7-1, Gakuen, Musashimurayama-shi, Tokyo 208-0011, Japan

We serially assessed the germicidal effects of ethanol (54%), didecyldimethylammonium chloride (DDAC, 0.1%), and alkaline substances (0.2% NaHCO₃ + 0.1% EDTA-4Na) used individually and in combination against various microorganisms including feline calicivirus (FCV), a surrogate for norovirus, and bacteriophages. Ethanol/DDAC/alkaline and DDAC/alkaline were the most effective against FCV. On the other hand, ethanol/DDAC/alkaline and ethanol/DDAC were the most effective against vegetative bacteria. DDAC/alkaline was effective against FCV but not against *Mycobacterium terrae*. Ethanol/DDAC/alkaline had broader germicidal activities than did individual and dual combination of ingredients.

(Accepted 27 September 2007)

Key words : Norovirus (ノロウイルス)/Ethanol (エタノール)/Alkaline (アルカリ剤)/
Bactericidal activity (殺菌活性)/Virucidal activity (殺ウイルス活性).

緒 言

ノロウイルスに対する不活化剤として、一般に次亜塩素酸ナトリウムの使用が推奨されているが、実用的見地から、適用条件によっては塩素ガスの発生、金属腐食などの材質に及ぼす悪影響が懸念されており、次亜塩素酸ナトリウムに代わる不活化剤が求められている。著者らは、各種殺菌剤、洗浄剤およびそれらの構成成分について、これまでノロウイルスの代替としてネコカリシウイルス

(FCV) を用いて不活化効果を検討し、次亜塩素酸ナトリウム以外に、過酢酸およびアルカリ物質などの化合物あるいは配合物がFCVを短時間に不活化することを報告した^{1, 2)}。エタノール、アルカリ物質およびカチオン系殺菌剤の組み合わせはFCVの不活化に有効であり、ウイルスを含む微生物に汚染された硬質表面の消毒に、その応用が期待できる。本報では、これらの化合物および配合系の各種ウイルスに対する不活化効果に加え、数種の細菌および真菌に対する殺菌効果を確認し、

¹サラヤ(株) バイオケミカル研究所 〒582-0028 大阪府柏原市玉手町24-12 ☎072-977-8000

²東京サラヤ(株) 営業本部 食品衛生部 検査室 〒140-0002 東京都品川区東品川1-25-8 ☎03-5461-8101

³国立感染症研究所 感染症情報センター 第6室 〒208-0011 東京都武蔵村山市学園4-7-1 ☎042-561-0771

有効性に関する配合意義を検討したので報告する。なお、現時点においてFCVの不活化剤に対する感受性がノロウイルスの感受性とどの程度異なるかは明確になっていないため、本研究においては2種類のバクテリオファージについてもFCVと同様の試験を実施した。

実験方法

1. 試験液の調製

基本成分として、エタノール、カチオン系殺菌剤およびアルカリ剤を選び、これらの単独および組み合わせについて、Table 1に示した①～⑦の試験液を調製した。なお、アルカリ物質を含む③、⑤および⑦については、クエン酸を用いてpHを10.7-10.8の範囲に調整した。

2. 供試ウイルス、宿主細胞および供試菌

試験に用いたウイルス、宿主細胞、細菌および真菌を以下に示した。

1) 供試ウイルス

Feline calicivirus F4 strain (FCV)

(東京大学大学院農学生命科学研究科 遠矢幸伸博士より分与)

phage A*

phage B*

* phage A および B は、独立行政法人 製品評価技術基盤機構 (nite) から MS2 および ϕ X 174 として入手して試験に用いたが、試験終了後、同機構から別のファージに入れ替わっていたとの連絡があった。現時点で、これらのファージが特

定できていないため、ここではそれぞれ A および B と表した。

2) 宿主細胞および宿主菌

Crandell Feline Kidney-cell line ATCC CCL-94 (CRFK 細胞) <FCV>

Escherichia coli NBRC13965 <phage A>

Escherichia coli NBRC13898 <phage B>

3) 供試細菌および真菌

Escherichia coli ATCC25922

Staphylococcus aureus ATCC25923

Staphylococcus aureus ATCC700698

(MRSA)

Pseudomonas aeruginosa ATCC27853

Mycobacterium terrae ATCC15755

Bacillus cereus IFO3836 (孢子)

Candida albicans ATCC10231

Aspergillus spp. (環境分離株)

3. FCV 不活化試験

ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM 培地, 日水製薬) に 9% ウシ胎仔血清 (FCS) および 5 mg ゲンタマイシンを添加して CRFK 細胞を培養し、これに FCV を感染させて、以下の手順で培養した。単層の細胞にウイルス保存液を加え、36°C 1 時間、5% CO₂ 条件下で吸着 (感染) させた後、OPTI-MEM 培地 (GIBCO) を加え、同条件で約 3 日間培養した。十分な細胞変性効果 (CPE) を確認した後、50 mL 遠沈管に回収し、凍結融解を繰り返してウイルスを溶出させた。その後、3000rpm で 20 分間遠心分離し、上清を回収して、-75°C で保存し、ウイルス保存液とした。

試験液 900 μ L にウイルス保存液 100 μ L を添加し、30 秒、1 分および 5 分間作用後、OPTI-MEM 培地で希釈し、作用を停止させた。この時、試験液が CRFK 細胞に及ぼす毒性を考慮し、作用液 100 μ L を 30 mL OPTI-MEM 培地に添加 (約 300 倍希釈) した。

その後、作用液を希釈し、96well プレートで培養しておいた CRFK 細胞に接種した。接種後のプレートを 36°C、5% CO₂ 条件下で 3 日間培養し、TCID₅₀ を求め、対照と比較したウイルス

Table 1. Composition of test solutions

Solution	Composition
①	ethanol (54%)
②	DDAC ^{a)} (0.1%)
③	alkaline agent ^{c)} (0.2% NaHCO ₃ + 0.1% EDTA ^{b)} ·4Na)
④	ethanol + DDAC ^{a)}
⑤	ethanol + alkaline agent ^{c)}
⑥	DDAC + alkaline agent ^{c)}
⑦	ethanol + DDAC + alkaline agent ^{c)}

^{a)} DDAC: didecyldimethylammonium chloride

^{b)} EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid

^{c)} pH of the solution was adjusted to 10.7-10.8 with citric acid.

の減少率を計算した。

4. 細菌および真菌に対する殺菌力

液体ブイオン培地(日水製薬)に *E. coli*, *S. aureus*, および *P. aeruginosa* を接種し, 37°C で18–24時間振とう培養し, 試験に供した。

M. terrae については, グリセロールストックを融解し, マイコプロス(極東化学工業)に接種し, 35°C で1週間振とう培養した。さらに, 培養後の菌液100 μ L を1%小川培地(極東化学工業)に接種し, 37°C で2週間培養した。発育した菌を回収し, Middlebrook 7H9 Broth (Becton Dickinson) に懸濁させた。その後, 30分間超音波処理し, 菌塊を分散させて試験に供した。

B. cereus の孢子は, ブイオン寒天培地 [液体ブイオン培地に1.5%の寒天末(シグマアルドリッチ ジャパン)を加えたもの] で1週間培養後, Beeby らの方法³⁾に従って調製し, 蒸留水に懸濁した。これを80°C で10分間加熱し, 栄養細胞を死滅させて冷蔵保存した。

C. albicans および *Aspergillus* spp. の真菌はポテトデキストロース寒天培地(日水製薬)で30°C, 48~72時間培養し, 0.1% polysorbate 80 溶液 [ノニオン OT-221 (日本油脂)] を用いて回収した。*Aspergillus* spp. については回収時に, 滅菌ガーゼでろ過した。

試験液4.5mL に菌液0.5mL を添加し, 30秒, 1分および5分間作用させた。作用後, 0.5mL を採り, あらかじめ用意しておいた4.5mL の中和剤溶液 [6% polysorbate 80 および2% 大豆レシチン溶液(和光純薬工業)] に添加し, 作用を停止させた後, 生理食塩水で段階希釈した。*M. terrae* については, Mycobacteria 7H11 寒天培地 (Becton Dickinson) を用いて混釈し, 2週間培養した。その他の細菌については, ブイオン寒天培地に混釈し, 24時間培養した。*C. albicans* および *Aspergillus* spp. についてはポテトデキストロース寒天培地に塗抹し, 48~72時間培養した。培養後, コロニー数 (CFU/mL) を測定した。

5. バクテリオファージの不活化

宿主菌を10mL 液体トリプトソーヤブイオン培地(日水製薬, TSB)に植菌し, 37°C で一晩振とう培養した。培養液を3000rpm, 10分間遠心分離し, 上清を除去し, 菌体を10mM MgCl₂ 溶液に懸濁した。蒸留水で希釈したファージ保存液0.1 mL と宿主菌液0.1mL を混合し, 試験管内で37°C で20分間感染させた。その後, 4 mL のトリプトソーヤブイオン軟寒天培地 (TSB に0.75%の寒天末を加えたもの) を添加し, 泡立てないように攪拌後, あらかじめ作製しておいたトリプトソーヤ寒天培地 (TSB に1.5%の寒天末を加えたもの) に重層し, 固化させて37°C で一晩培養した。培養後, プラークの形成が確認されたシャーレに TSB 培地を添加し, コンラージ棒で表面を擦り, 遠沈管に回収した。1000rpm, 10分間遠心分離した後, 上清を回収し, ファージ保存液とした。

試験液0.9mL にファージ保存液0.1mL を添加し, 30秒, 1分および5分間作用させた。作用後, その0.1mL を中和剤溶液0.9mL に添加して作用を停止させ, 蒸留水で段階希釈した。この希釈液0.1mL と宿主菌液0.1mL を試験管内で混合後, 37°C で20分間静置した。上記と同様の条件で培養後, プラーク数 (PFU/mL) を測定した。

実験結果

1. ウイルスに対する不活化効果

エタノール, アルカリ物質およびカチオン系殺菌剤 (以下, DDAC) を基本組成とする試験液①~⑦ (Table 1) のFCV に対する不活化効果を Fig. 1 に示した。DDAC およびアルカリ物質を配合した系⑥およびエタノール, DDAC およびアルカリ物質の3成分を組み合わせた系⑦では作用後30秒間で, FCV のウイルス感染価を99.9%以上減少させた。また, エタノールおよびDDAC の2成分配合系⑤では, 作用後1分間では93.4%のウイルス感染価の減少しか見られず, 大きな不活化効果は見られなかったが, 5分間作用後では99.9%のウイルス感染価の減少が見られた。

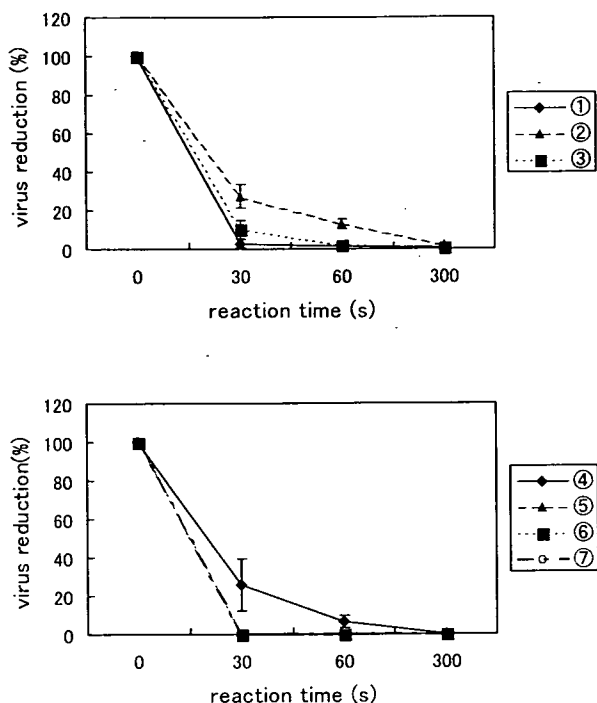


Fig.1. FCV inactivation by test solutions.

それぞれ単独の系では、作用時間にともない効果は増し、5分間作用後にはエタノールおよびアルカリ物質で99%以上の感染価の減少が見られたが、1分間の作用では大きな効果は得られず、特に、DDACは87.1%の感染価の減少しか見られなかった。しかし、⑤のエタノールにアルカリ物質を添加した場合および⑥のDDACにアルカリ物質を添加した場合、それぞれ単独の成分よりもウイルス感染価の減少が大きくなった。これは、エタノールおよびDDACのpHをアルカリ領域に変化させることで、それぞれ単独よりも、ウイルスの不活化効果が高くなることが示唆された。

バクテリオファージに関しては、すべての組み合わせについて検討していないが、エタノール、DDACおよびアルカリ物質の3成分の配合系⑦は、30秒間作用後、2種類のファージを検出限界以下まで不活化した (Table 3)。

2. 細菌・真菌に対する殺菌効果

Table 1 に示した試験溶液の細菌 (孢子) およ

Table 2. Effects of test solutions against bacteria

Organism	Initial count (logCFU/ml) two trials	Time (sec)	Log reduction ^{a)}						
			Test solution						
			①	②	③	④	⑤	⑥	⑦
<i>E. coli</i>	8.72	30	-	-	1.36	-	-	-	-
	8.40	60	-	-	1.50	-	-	-	-
		300	-	-	1.77	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	7.32	30	-	-	0.00	-	-	-	-
	7.65	60	-	-	0.09	-	-	-	-
		300	-	-	0.02	-	-	-	-
MRSA	8.72	30	-	-	0.96	-	-	-	-
	8.30	60	-	-	0.45	-	-	-	-
		300	-	-	0.50	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	8.72	30	-	5.27	3.08	-	-	3.95	-
	7.90	60	-	6.02	3.33	-	-	7.05	-
		300	-	-	3.42	-	-	-	-
<i>M. terrae</i>	7.95	30	6.37	0.47	0.00	-	6.29	0.29	-
	7.45	60	6.12	0.59	0.00	-	6.17	0.44	-
		300	-	1.10	0.10	-	-	0.99	-
spore (<i>B. cereus</i>)	3.00	30	0.28	0.14	0.40	0.31	0.32	0.18	0.30
	3.00	60	0.37	0.19	0.47	0.34	0.40	0.35	0.42
		300	0.31	0.15	0.43	0.21	0.30	0.68	0.25

^{a)} Log reduction = log (initial count) - log (survival count)

Log reduction values in the table are the average of two trials performed.

-: Bacteria were not detected (less than 10 CFU/mL) in both trials.

Table 3. Effects of ethanol/DDAC/alkaline against other microorganisms

Organism	Initial count (logCFU/mL or logPFU/mL) two trials	Time (sec)	Log reduction
<i>C. albicans</i>	7.98	30	—
	6.30	60	—
		300	—
<i>Aspergillus</i> spp.	6.85	30	—
	7.60	60	—
		300	—
phage A	9.11	30	—
	7.88	60	—
		300	—
phage B	6.43 ^{a)}	30	—
		60	—
		300	—

^{a)}: Only one trial was performed

—: Organisms were not detected (less than 100 CFU/mL or 100 PFU/mL).

び真菌に対する殺菌効果を調べた。その結果を Table 2 および 3 に示した。エタノール、DDAC およびアルカリ物質の 3 成分を配合した系⑦では、30秒間作用後、細菌胞子を除く、全ての栄養型細菌および真菌が検出されなくなり、高い殺菌効果が得られた。

DDAC およびアルカリ物質の配合系⑥は FCV に有効であったが、*M. terrae* に対する効果は弱く、また、*P. aeruginosa* のを殺滅するのに、5 分間の作用を必要とした。一方、エタノールおよび DDAC の配合系④は FCV に対する短時間の不活化効果は低いものの、全ての栄養型細菌を 30 秒以内に殺滅させた。

エタノール単独では、*M. terrae* を殺滅させるのに 5 分間の作用が必要である以外は、30秒間の作用時間で細菌は検出されなかった。DDAC 単独では、*E. coli*, *S. aureus* に対しては有効であったが、*M. terrae* に対して 5 分間作用させても殺菌効果は低く、*P. aeruginosa* の殺滅にも 5 分間の作用が必要であった。アルカリ物質単独では、今回試験した全ての菌に対して、ほとんど殺菌効果は認められなかった。

なお、*B. cereus* の胞子に対しては、細菌に対して最も有効であった 3 成分系を用いても、ほとんど殺菌効果は認められなかった。

考 察

著者らは、これまで、強アルカリ物質ならびにアルコールおよびカチオン系殺菌剤をアルカリ性にする事で、ノロウイルス代替として用いた FCV に有効であることを報告した^{1, 2)}。ここでは環境用の殺菌剤として応用することを考え、より温和な条件におけるウイルスや各種微生物に対する有効性を検討した。すなわち、pH を弱アルカリ性、危険物対象外 (60%以下) になるようにエタノール濃度を 54% に調整し、カチオン系殺菌剤を配合した。それらの組み合わせについて殺菌およびウイルス不活化効果を評価した。

ノロウイルスはこれまで人工的に培養ができなかったため⁴⁾、同じカリシウイルス科の FCV を代替として用いた不活化試験が一般的に行われてきた。アメリカの EPA ではノロウイルス代替として FCV を用いた不活化試験が確立しており、細胞毒性の有無により、3~4 log 以上感染価が減少すれば、殺ウイルス剤として有効であるとされている⁵⁾。本試験において、エタノール、DDAC およびアルカリ物質の 3 成分配合系⑦は FCV に対して 30 秒間でも 99.9% 以上の感染価の減少が見られており、EPA 基準と照らしあわせると、十分有効であることを示している。しかし、実際にその薬剤に対する微生物の感受性が同じであるとはいえない。これまで、ノロウイルス懸濁液を飲ませたヒトボランティアによる実験において、ノロウイルスはポリオウイルスやバクテリオファージよりも次亜塩素酸ナトリウムに対して抵抗性が強いという報告⁶⁾がある一方、同様な実験に代替の FCV を用いた場合、ポリオウイルスよりも抵抗性が弱いという報告^{6, 7)}がある。これは、FCV がノロウイルスよりも次亜塩素酸ナトリウム等消毒剤に対する抵抗性が弱い可能性を示唆している。そこで、本研究ではこれら報告を考慮し、比較的薬剤に対する抵抗性が強く、エンテロウイルスの代替としてよく用いられている MS2 および ϕ X174 ファージに対して試験を行ったはずであるが、別のファージであることが判明したので、今後、あらためて MS2 および ϕ X174 ファージを用いて試験を行う必要がある。さらに、薬剤に

対する抵抗性が強い他のウイルスについても検討する必要があると考えられる。さらに、最近になって、小腸上皮の三次元培養細胞でノロウイルスによる細胞変性効果とノロウイルスの増殖が認められることが報告⁸⁾されており、実際にノロウイルスを用いた不活化試験による確認も可能となる。

一般的に消毒剤として汎用されているエタノール製剤やカチオン系界面活性剤配合消毒剤はノロウイルスのようにエンベロープを持たない親水性のウイルスに対する不活化効果は高くはないことが報告されている⁹⁻¹⁵⁾。本研究においても、エタノールおよび DDAC 単独では高い不活化効果は得られなかったが、これらの pH をアルカリ側にシフトすることで FCV の不活化効果が高くなることが示された。この結果は著者らが以前に行った結果と一致する^{1, 2)}。これまで、いくつかのウイルスにおいて、pH がアルカリ性になると、ウイルスを形成するカプシドタンパク質が分解されることが報告^{16, 17)}されていることから、ウイルスの不活化にアルカリ物質が大きく関与しており、アルカリによりダメージを受けたウイルスに対して、エタノールあるいはカチオン系殺菌剤を作用させることでより高いウイルスの不活化効果が得られたと考えられる。

細菌に対しては、エタノールおよび DDAC は単独でも大腸菌、黄色ブドウ球菌および緑膿菌に対して殺菌効果が見られた。しかし、これまでも多くの知見があるように、栄養型細菌の中で最も薬剤に対する抵抗性が強いと言われている抗酸菌に対しては、エタノール単独では効果が見られたが、DDAC はほとんど殺菌効果を示さなかった¹⁸⁻²¹⁾。また、エタノールと DDAC を組み合わせると、エタノール単独よりも有効であった。これには、カチオン系殺菌剤の特徴と抗酸菌の構造が関わっていると考えられる。カチオン系殺菌剤は陽電荷を持つ原子団が菌体表面に吸着し、細胞内に浸透して菌体タンパク質に影響を及ぼすことで菌に作用すると考えられているが^{22, 23)}、抗酸菌は細胞壁に特異な脂質を多量に含むため、酸およびアルカリに抵抗性を持ち、カチオン系殺菌剤等の消毒剤の細胞内への浸透を阻害する¹⁹⁾。

したがって、DDAC 単独では効果が得られなかったと考えられる。しかし、アルコールと同時にカチオン系殺菌剤を作用させた場合には、アルコールの作用で細胞壁や細胞膜に影響を及ぼすため²⁴⁾、カチオン系殺菌剤が細胞内に浸透し、菌体タンパク質に作用できるので、エタノールと DDAC の併用により効果が増したと考えられる。このようにウイルスおよび細菌などの各種微生物に対する効果を加味した場合、エタノール、DDAC およびアルカリ物質の 3 成分を混合した薬剤は非常に有効であると考えられる。

さらに、これまで、ノロウイルスに有効である薬剤として推奨されている、次亜塩素酸ナトリウム^{6, 9)}に比べ、金属腐食や漂白作用による悪影響が少ないことから、3 成分を組合せた本薬剤は環境表面の微生物汚染除去に非常に有用であると考えられる。

結 論

エタノール (54%)、DDAC (0.1%) およびアルカリ物質 (0.2% NaHCO₃ + 0.1% EDTA-4Na) の 3 成分のそれぞれ単独およびそれらの組み合わせについて、FCV やバクテリオファージを含む各種微生物に対する殺菌および殺ウイルス活性を検討した。その結果、いずれも、細菌胞子には無効であった。3 成分を組み合わせることにより、単独または 2 成分の組み合わせに比べると、

Table 4. Summary of biocidal efficacy

Organism	Test solution						
	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦
<i>E. coli</i>	◎	◎	×	◎	◎	◎	◎
<i>S. aureus</i>	◎	◎	×	◎	◎	◎	◎
MRSA	◎	◎	×	◎	◎	◎	◎
<i>P. aeruginosa</i>	◎	△	×	◎	◎	△	◎
<i>M. terrae</i>	△	×	×	◎	△	×	◎
spore (<i>B. cereus</i>)	×	×	×	×	×	×	×
<i>C. albicans</i>	NT	NT	NT	NT	NT	NT	◎
<i>Aspergillus</i> spp.	NT	NT	NT	NT	NT	NT	◎
FCV	×	×	×	×	○	◎	◎
phage A	NT	NT	NT	NT	NT	NT	◎
phage B	NT	NT	NT	NT	NT	NT	◎

◎, ○, △: Organisms were not detected after 30s (◎), 1min (○) and 5min (△).

×: Organisms were detected after 5min.

NT: Not tested

殺菌および殺ウイルス活性のスペクトルが広いことがわかった (Table 4)。今回検討した3成分混合溶液は、危険物対象外である上、弱アルカリ性であり、ノロウイルス対策としてだけではなく、環境用消毒剤として、安全、かつ、簡便に使用できると思われる。

文 献

- 1) 古田太郎. (2006). ノロウイルス現場対策 (丸山務 監修), 幸書房, pp. 84-90
- 2) 古田太郎. (2006). 製造現場の洗浄・殺菌の基本—ウイルス対策を中心に—. 月刊フードケミカル, 22 (11), 83-87.
- 3) Beeby, M. M., Whitehouse, C. E. (1965). A bacterial spore test piece for the control of ethylene oxide sterilization. *J. Appl. Bact.*, 28, 349-360.
- 4) Duizer, E., Schwab, KG., Neill, FH., Atmar, RL, Koopmans, MPG., Estes, MK. (2004). Laboratory efforts to cultivate norovirus. *J. Gen. Virol.*, 85, 79-87.
- 5) EPA. (2000). Confirmatory virucidal effectiveness test using feline calicivirus as surrogate for Norovirus.
http://www.epa.gov/pesticides/antimicrobials/pdf_files/confirmatory_virucidal_test.pdf#search='Confirmatory%20virucidal%20effectiveness%20test%20using%20feline%20calicivirus%20as%20surrogate%20for%20Norovirus'
- 6) Keswick, BH., Satterwhite, TK., Johnson, PC., Dupont, HL., Secor, SL., Bitsura, JA., Gary, GW., Hoff, JC. (1985). Inactivation of norwalk virus in drinking water by chlorine. *Appl. Environ. Microbiol.*, 50, 261-264.
- 7) Tree, JA., Adams, MR., Lees, DN. (2005). Disinfection of feline calicivirus (a surrogate for norovirus) in waste water. *J. Appl. Microbiol.*, 98, 155-162.
- 8) Straub, T., Honer zu Bentrup, K., Orosz-Coghlan, P., Dohnalkova, A., Mayer, BK., Bartholomew, RA., Valdez, CO., Bruckner-Lea, CJ., Gerba, CP., Abbaszadegan, M., Nickerson, CA. (2007). *In vitro* cell culture infectivity assay for human Noroviruses. *Emerg. Infect. Dis.*, 13, 396-403.
- 9) Thurston-Enriquez, JA., Haas, CN., Jacangelo, J., Gerba, CP. (2003). Chlorine inactivation of adenovirus type 40 and feline calicivirus. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 3979-3985.
- 10) Doultree, JC., Druce, JD., Birch, CJ., Bowden, DS., Marshall, JA. (1999). Inactivation of Feline calicivirus, a Norwalk virus surrogate. *J. Hosp. Infect.*, 41, 51-57.
- 11) Gulati, BR., Allwood, PB., Hedberg, CW., Goyal SM. (2001). Efficacy of commonly used disinfectants for the inactivation of calicivirus on strawberry, lettuce, and a food contact surface. *J. Food. Prot.*, 64, 1430-1434.
- 12) Malik, YS., Maherchandani, S., Goyal, SM. (2006). Comparative efficacy of ethanol and isopropanol against feline calicivirus, a norovirus surrogate. *Am. J. Infect. Control*, 34, 31-35.
- 13) Gehrke, C., Steinmann, J., Goroncy-Bermes, P. (2004). Inactivation of feline calicivirus (formerly Norwalk-like virus), by different types of alcohol *in vitro* and *in vivo*. *J. Hosp. Infect.*, 56, 49-55.
- 14) 山崎謙治, 木村朝昭, 左近直美, 奥野良信 (2002), 各種アルコール系殺菌消毒剤のウイルス不活化試験, 医学と薬学., 48, 441-446.
- 15) 野田雅博, 松田俊二, 小林正夫 (2000), 消毒剤の殺ウイルス効果に関する検討—殺ウイルス効果に及ぼす血清蛋白の影響—. 感染症学雑誌., 74, 664-669.
- 16) Katagiri, S., Aikawa, S., Hinuma, Y. (1971). Stepwise degradation of poliovirus capsid by alkaline treatment. *J. Gen. Virol.*, 13, 101-109.
- 17) Shirai, J., Kanno, T., Inoue, T., Mitsubayashi, S., Seki, R. (1997). Effects of quaternary ammonium compounds with 0.1% sodium hydroxide on swine vesicular disease virus. *J. Vet. Med. Sci.*, 59, 323-328.
- 18) James, G. Hirsch. (1954). The resistance of tubercle bacilli to the bactericidal action of benzalkonium chloride (ZEPHIRAN). *Am. Rev. Tuberc.*, 70, 312-319.

- 19) 原田七寛, 奥村由喜子, 藤富洋子, 山本千春, 姜 栄子, 屋敷律子 (1982). 常用消毒薬の抗酸菌に対する殺菌効果の検討. 大阪府立公衛研究所報, 公衆衛生編, 20, 33-36.
- 20) Best, M., Sattar, SA., Springthorpe, VS., Kennedy, ME. (1988). Comparative mycobactericidal efficacy of chemical disinfectants in suspension and carrier tests. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 2856-2858.
- 21) Best, M., Satter, SA., Springthorpe, VS., Kennedy, ME. (1990). Efficacies of selected disinfectants against *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.*, 28, 2234-2239.
- 22) 坂口 進 (1991). 殺菌剤の作用機構と耐性菌問題. 環境管理技術, 9, 34-44.
- 23) Furuta, T. (1992). Effect of Alkaline builders and Surfactants on the Bactericidal Activity of Didecyldimethylammonium Chloride. 防菌防黴, 20, 617-622.
- 24) Yamashita, M. (1996). Alcohol Toxicity in Microorganism. 防菌防黴, 24, 195-219.

資料

神奈川県におけるウイルス性
胃腸炎の集団発生状況
(平成18年度)

宮原香代子, 原田美樹, 片山 丘, 古屋由美子

Occurrence of viral gastroenteritis in
Kanagawa Prefecture
(April, 2006-March, 2007)

Kayoko MIYAHARA, Miki HARADA
Takashi KATAYAMA and Yumiko FURUYA

ウイルスによる胃腸炎の集団発生は、主に食品を介する食中毒やヒトからヒトへ伝播する感染性胃腸炎として冬季を中心に起きている。その原因ウイルスには、ノロウイルスをはじめサポウイルス、ロタウイルス、アデノウイルスなどがある。例年、胃腸炎を起こす原因ウイルスを検索するために、県域の定点医療機関より搬入された感染性胃腸炎患者便について病原体検査を行っている。その結果、今年度はノロウイルスの検出数が例年に比べ1ヶ月ほど早い11月から増加をはじめ、ピーク時の12月には前年度同月の2.5倍となった(図1)。またこの時期、新聞やテレビでノロウイルスによる胃腸炎の集団発生が多く報道されるようになり、ノロウイルスが全国的にも流行していた。

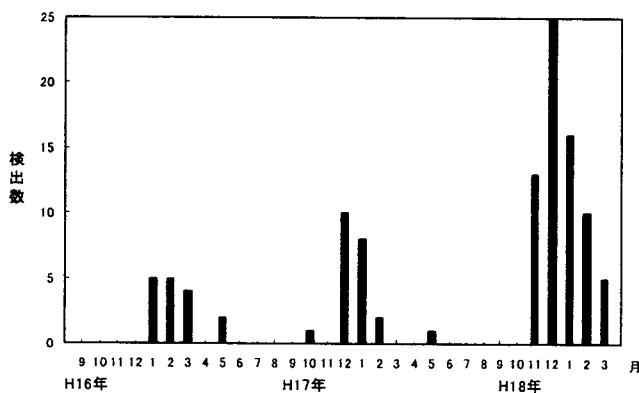


図1 定点医療機関より搬入された胃腸炎患者便からのノロウイルス検出状況

神奈川県衛生研究所 微生物部
〒253-0087 茅ヶ崎市下町屋 1-3-1

我々は胃腸炎の集団発生時にその感染拡大を防止するため、原因ウイルスや感染源の早期解明を目的とした検査および調査を実施している。平成18年4月から平成19年3月に県域保健所から検査依頼があった胃腸炎の集団発生は98事例で、検体数は便および吐物1,241検体、食品64検体、ふきとり13検体の1,318検体であった。平成17年度の検体数が625検体であったのに対し約2倍に増加した。検査方法については、ノロウイルスは定量PCR、サポウイルスは逆転写PCR、A群ロタウイルスとアデノウイルスはイムノクロマトを用いた。また原因ウイルスを広く迅速に検索するため、有症者の検体を中心に電子顕微鏡観察を行った。その結果、75事例の便および吐物467検体からウイルスが検出されたが、食品およびふきとりからは検出されなかった。75事例のうち、ノロウイルスが74事例から、小型球形ウイルスが1事例から検出された。ノロウイルスが検出された事例の内訳は、食中毒と判定されたものが10事例、感染性胃腸炎と判定されたものが14事例、有症苦情が16事例、他の自治体からの関連調査が34事例であった。小型球形ウイルスが検出された1事例は他の自治体からの関連調査であった。

食中毒10事例において検出されたノロウイルス遺伝子は、事例9の患者便1検体がgenogroup I とgenogroup II の混合で、それ以外は全てgenogroup II であった(表1)。genogroup I とgenogroup II が混合して検出される場合は魚介類の生食を原因とすることが多いが、事例9の患者1名についての摂食状況は不明であった。この事例における他の陽性患者便39検体からはgenogroup II のみが検出されたことから、genogroup I とgenogroup II が検出された患者1名は、この集団発生との関連は少ないと考えられた。また、定量PCRと同時にを行った患者便の電子顕微鏡観察では、8事例の35検体から小型球形ウイルス粒子が検出され、これらの粒子はノロウイルスであると確定された。

食中毒事例は、定点医療機関からの病原体検査結果と同様に11月に多く発生していた。また原因食品や調理施設の汚染場所を調べるため、事例2, 3, 5, 10については食品およびふきとりの検査を行ったがノロウイルスは検出されず、原因食品および汚染場所の特定はできなかった。一方、事例9では調理従事者便31検体中の約3割から、また他の事例においても複数の調理従事者からノロウイルスが検出され、調理従事者による汚染の拡大が食中毒の原因のひとつであると考えられた。

さらに今回ノロウイルスが検出された12名(検出例A~L)について、ノロウイルスが便中に排泄される期間を調べる目的で、継続的に検査を行った(表2)。経過日数は初回の検出日を基準とし、約2週間後に1回、その後約

表1 平成18年度食中毒事例

事例番号	発生年月	管轄保健福祉事務所	原因施設	原因食品	検体	ノロウイルス定量PCR			電子顕微鏡観察	
						検体数	陽性数	検出遺伝子	検体数	陽性数
1	H 18.3	厚木	飲食店	不明	患者便	20	16	G II	10	6
					調理従事者便	19	1	G II	N.T.	
2	H 18.11	茅ヶ崎	仕出し屋	不明	患者便	39	39	G II	13	10
					調理従事者便	17	3	G II	N.T.	
					食品	5	0		N.T.	
3	H 18.11	小田原	旅館	不明	患者便	3	3	G II	3	0
					調理従事者便	52	6	G II	N.T.	
					ふきとり	5	0		N.T.	
4	H 18.11	茅ヶ崎	仕出し屋	不明	患者便	7	6	G II	5	1
					調理従事者便	10	2	G II	N.T.	
5	H 18.11	三崎	旅館	不明	患者便	2	2	G II	2	0
					調理従事者便	58	4	G II	N.T.	
					食品	2	0		N.T.	
6	H 18.11	大和	飲食店	不明	患者便	10	10	G II	4	1
					調理従事者便	2	1	G II	N.T.	
7	H 18.11	茅ヶ崎	給食施設	不明	患者便	17	17	G II	8	8
					調理従事者便	19	4	G II	N.T.	
8	H 18.12	厚木	給食施設	不明	患者便	16	16	G II	5	5
					調理従事者便	12	1	G II	N.T.	
9	H 18.12	平塚	飲食店	不明	患者便	49	40	G II	4	2
					調理従事者便	31	9	G II	N.T.	
10	H 19.1	鎌倉	飲食店	不明	患者便	8	7	G II	2	2
					調理従事者便	8	3	G II	N.T.	
					食品	6	0		N.T.	

G II : genogroup II

N.T. : 検査せず

* : 1検体よりノロウイルスgenogroup I、genogroup IIを検出

1週間ごとに検査を行った。検出例Kについては2週間後の検体が得られず、3週間後の検査ではノロウイルスが検出されなかったため、排泄されていた期間を確認することができなかった。その他の11名について2週間（10～14日）後に行った検査では、6名からノロウイルスが検出された。さらに3週間（17～20日）後の検査でも、前回ノロウイルスが検出された6名中2名から検出された。この検出例DとHの2名については、4週間（26、28日）後の検査においても検出が続き、Dは36日後、Hは39日後の検査でノロウイルスは検出されなくなった。今回は検査対象が少ないものの、4週間もの長期間にわたり便中にノロウイルスが排泄される場合があることが確認された。以上の結果より、食中毒予防の観点から調理従事者は、一度ノロウイルスが体内に入ると長期間ウイルスが排泄される可能性があることを認識して、自己の健康管理および手洗いの励行や調理用手袋着用など、さらなる注意が必要であると考えられた。

感染性胃腸炎14事例において検出されたノロウイルス遺伝子は、全てgenogroup IIであった（表3）。また定量PCRと同時に行った発症者便の電子顕微鏡観察では、13事例の37検体から小型球形ウイルス粒子が検出され、これらの粒子はノロウイルスであると確定された。

表2 経過日数による便中ノロウイルス遺伝子の検出状況

検出例	初回検出後の経過日数			
	2週間 (10～14日)	3週間 (17～20日)	4週間 (26、28日)	5週間 (36、39日)
A	+	-		
B	-			
C	+	-		
D	+	+	+	-
E	-			
F	-			
G	-			
H	+	+	+	-
I	+	-		
J	+	-		
K	-	-		
L	-			

+ : 検出 - : 不検出

感染性胃腸炎の発生施設は、高齢者施設が8事例で最も多く、小学校が2事例、病院・宿泊施設、保育園、幼稚園がそれぞれ1事例であった。感染性胃腸炎が疑われた場合には施設内の感染拡大を防ぐために、発症者だけではなく施設職員等を含む広い範囲で検査を行った。今年度は高齢者施設での発生が多く認められたが、そのうちの事例11では、利用者10名中10名、症状のある職員7名中6名、さらに症状のない職員3名中1名からノロウイルスが検出された。また発症者数が多い事例6においても、園児だけでなく職員も発症し、症状のない職員15名中6名からノロ

表3 平成18年度感染性胃腸炎事例

事例 番号	発生年月	管轄保健 福祉事務所	発生施設	検体	ノロウイルス定量PCR			電子顕微鏡観察	
					検体数	陽性数	検出遺伝子	検体数	陽性数
1	H 18.4	平塚	小学校	発症者便	11	10	GII	10	3
2	H 18.5	厚木	小学校	発症者便	3	3	GII	3	2
3	H 18.10	秦野	病院	発症者便	5	4	GII	5	2
4	H 18.11	平塚	宿泊施設	発症者便	1	1	GII	1	0
				非発症者便	3	1	GII	N.T.	
				利用者 調理従事者	3	1	GII	N.T.	
5	H 18.11	茅ヶ崎	高齢者施設	発症者便	6	6	GII	4	4
				非発症者便	8	0		N.T.	
				園児 職員	38	35	GII	8	7
6	H 18.11	小田原	保育園	職員	6	5	GII	N.T.	
				非発症者便	15	6	GII	N.T.	
				職員 調理従事者	3	0		N.T.	
				ふきとり	8	0		N.T.	
7	H 18.12	三崎	高齢者施設	発症者便	2	2	GII	2	1
8	H 18.12	小田原	幼稚園	発症者便	3	3	GII	3	2
9	H 18.12	茅ヶ崎	高齢者施設	発症者便	7	4	GII	6	2
				非発症者便	7	1	GII	N.T.	
10	H 18.12	秦野	高齢者施設	発症者便・吐物	4	4	GII	3	3
11	H 18.12	茅ヶ崎	高齢者施設	利用者	10	10	GII	6	6
				職員	7	6	GII	N.T.	
				調理従事者	1	1	GII	N.T.	
				非発症者便	3	1	GII	N.T.	
12	H 18.12	茅ヶ崎	高齢者施設	発症者便	9	0		N.T.	
12	H 18.12	茅ヶ崎	高齢者施設	発症者便	2	2	GII	2	2
13	H 19.3	三崎	高齢者施設	利用者	1	1	GII	1	1
				職員	1	1	GII	1	0
14	H 19.3	鎌倉	高齢者施設	発症者便	7	7	GII	4	2
				非発症者便	17	2	GII	N.T.	
				調理従事者 食品	6	0		N.T.	

GII : genogroup II

N.T. : 検査せず

ウイルスが検出された。高齢者施設や保育園などの職員は、発症者の便や吐物の処理を行うため感染する危険性が高い。また聞き取り調査で症状がないとする職員からもノロウイルスが検出されたことから、このような施設で働いている職員は汚染を広め二次感染を引き起こす可能性があると考えられた。よって施設内でノロウイルスによる胃腸炎が発生した場合は、発症者のみならず症状のない職員等を含む施設全体の感染状況を早期に把握し対応することが、汚染拡大防止のために重要であると考えられた。

今年度は全国的なノロウイルスの大流行があり、県

域においてもウイルス性胃腸炎の集団発生は、全てノロウイルスを原因とするものであった。ノロウイルスによる胃腸炎の集団発生は毎年増加し、今後も今シーズンのような大流行が起こる可能性が懸念される。集団発生時には速やかに原因ウイルスを検出し感染の拡大を防止するとともに、集団発生を予防するために感染源および感染経路の解明が重要であると考えられた。

最後に、衛生研究所への検体搬入や情報提供にご尽力いただいた各保健福祉事務所、県生活衛生課および健康増進課の方々に深謝いたします。

(平成19年7月20日受理)

= 短 報 =

LightCycler[®] を用いたノロウイルス遺伝子検出法の検討

森田幸雄^{*1,†}・藤田雅弘^{*1}・斎藤美香^{*1}・塚越博之^{*1}・星野利得^{*1}
加藤政彦^{*1}・小澤邦寿^{*1}・西尾 治^{*2}・木村博一^{*2}

(^{*1}群馬県衛生環境研究所, ^{*2}国立感染症研究所感染症情報センター)

(受付: 平成 19 年 4 月 26 日)

(受理: 平成 19 年 9 月 21 日)

Detection Assays of *Norovirus* Genome Using LightCycler[®]

Yukio MORITA^{*1,†}, Masahiro FUJITA^{*1}, Mika SAITO^{*1},
Hiroyuki TSUKAGOSHI^{*1}, Toshie HOSHINO^{*1}, Masahiko KATO^{*1},
Kunihisa KOZAWA^{*1}, Osamu NISHIO^{*2} and Hirokazu KIMURA^{*2}

(^{*1}Gunma Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences, 378
Kamioki, Maebashi, Gunma 371-0052; [†]Corresponding author)

(^{*2}National Institute of Infectious Disease, Infectious Disease Surveillance Center, 4-7-1
Gakuen, Musashimurayama, Tokyo 208-0011)

In 2003, the Ministry of Health, Labour and Welfare in Japan presented the official assay using ABI PRISM 7000[®] for the detection of *Norovirus* (NV) genogroups I (GI) and II (GII). We have recently modified the official assay and, using LightCycler[®] PCR equipment, have developed the "LC cDNA" and "LC One-Step" detection assays. These two assays enabled detection and quantitation of the NV genome within 6 hrs using the LC cDNA assay, and within 3 hr using the LC One-Step assay. The primers and probes used in both assays were identical to those used in the official assay, because there are no idiosyncrasies between them. The detection limits of our assays for the GI and GII genomes were 10 copies/5 μ l. Results of field samples using both the LC cDNA and One-Step assays were the same. In correlation analysis between log transformed genome copy numbers of the LC cDNA and One-Step assays, fecal samples from food poisoning cases ($n=27$) were $y=0.9627x-0.1034$ ($R^2=0.9888$), and patient samples from a hospital ($n=22$) were $y=1.0064x-0.3473$ ($R^2=0.9610$). Utilizing LightCycler[®] PCR equipment, our assays detected NV GI and GII. In particular, the One-Step assay could detect within 3 hrs; hence, it is a very useful laboratory technique for the detection of NV from field samples.

Key words: LightCycler[®] PCR equipment, *Norovirus*, One-Step Real-Time PCR assay

緒 言

カリシウイルス科に属するノロウイルス (*Norovirus*, 以下「NV」と略) は 1968 年に米国オハイオ州ノーウォークの小学校で発生した集団胃腸炎から検出され, 1972 年に免疫電子顕微鏡下でその形態が明らかになった²⁾. 今日, わが国における NV 感染症は小児や高齢者のみならず, 全年齢層において発生しており, 本ウイルスは「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関

する法律」の 5 類感染症の感染性胃腸炎の原因物質の一つとして重要であると推定される. さらに, NV は「食品衛生法」において平成 9 年 5 月から食中毒原因物質として取扱われるようになり, 平成 16 年の食中毒統計 (<http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/04hassei/xls/04hassei.xls>) では, 全国で発生した食中毒 (患者数 28,175 名, 事件数 1,666 件) のうち, NV によるものは 12,537 名 (44.5%), 277 件 (16.6%) で, 患者数は第 1 位, 事件数はカンピロバクター (558 件) に次いで第 2 位であり, 食品衛生学的に重要なウイルスである. よって, NV は感染症・食中毒の両面から原因物質として同定検査を実施する必要性が高く, さらに, 防疫

[†] 連絡先

^{*1} ☎371-0052 前橋市上沖町 378

^{*2} ☎208-0011 東京都武蔵村山市学園 4-7-1

対策や行政処分を早期に講じるために、正確で迅速な検査が求められている。

NV は培養細胞や実験動物への感染がいまだに成功していないウイルスで、ヒトが唯一の感受性動物であるといわれている^{1,5)}。今日、NV の検出には遺伝子学的検出法が汎用されている。厚生労働省は「ノロウイルス検出法について」(医薬品食品局食品安全部監視安全課長通知, 食安監発第 1105001 号, 平成 15 年 11 月 5 日)の中で、ABI PRISM 7000[®] (Applied Biosystems) を検出器として使用した「リアルタイム PCR 法によるノロウイルスの定量的検出法」(以下「公定法」と略)を提示している⁴⁾。公定法は、検体から RNA を抽出し DNase 処理を実施後、RT 反応によって cDNA を合成、次にリアルタイム PCR を用いてその cDNA を増幅検出するものであり、測定結果が得られるまで約 6 時間を要し、さらに抽出 RNA も cDNA 合成時には約 2.5 倍希釈となっている。

LightCycler[®] (以下、LightCycler[®] 表記のものは Roche Diagnostics) はキャピラリー内で短時間に標的遺伝子を増幅し、検出するリアルタイム PCR 装置である。われわれは、公定法に従い cDNA を合成後、LightCycler[®] を用いて検出する方法 (以下「LC cDNA 法」と略)、および、キャピラリー内で抽出 RNA を One-step 反応で cDNA に合成、増幅し LightCycler[®] を用いて検出する方法 (以下「LC One-Step 法」と略) の 2 つの検出系を検討したので以下に概要を報告する。

材料および方法

1. LC cDNA 法および LC One-Step 法で用いたプライマー、プローブ、試薬、組成、反応条件および機器等

LC cDNA 法および LC One-Step 法で使用したプライマーおよびプローブを Table 1 に、組成ならびに反応条件を Table 2 に示した。両方法ともに、カプシド領域を増幅・検出するプライマーおよびプローブで、公定法と同じものを用いた。

LC cDNA 法は、公定法に準じて検体から RNA を抽

出後、DNase 処理、RT 反応を実施し、得られた cDNA をテンプレートにして、LightCycler[®] FastStart DNA Master Hyb Probe を用いて反応液を作製した。反応は 95°C、10 分を 1 回、次いで 95°C、10 秒、60°C、25 秒を 45 回、その後 40°C、30 秒を実施した。

LC One-Step 法は公定法に準じて検体から抽出した RNA をテンプレートにして、LightCycler[®] RNA Amplification Kit Hybridization Probes を用いて反応液を作製した。反応は 52°C、10 分、95°C、30 秒を 1 回、次いで 95°C、10 秒、60°C、25 秒を 45 回、その後 40°C、30 秒を実施した。

検出機器は LightCycler[®] DX-400 を用いた。検出・分析は LightCycler[®] Software ver. 4.0 を用いた。

条件設定および野外検体測定に際して、外部標準として国立感染症研究所感染症情報センター第六室より提供された NVGI および GII コントロールプラスミド DNA (以下「標準 DNA」と略) を用いた。なお GI 標準 DNA はプライマー COG1F と G1SKR で増幅される 381 bp (GenBank Accession No. M87661, Position 5291-5671) および GII 標準 DNA はプライマー COG2F と G2SKR で増幅される 387 bp (X86557, Position 5003-5389) である³⁾。

2. LC cDNA 法と LC One-Step 法の検出条件および検出限界値の測定

検量線および検出限界値の測定は、GI および GII それぞれの標準 DNA を $10^1 \sim 10^7$ copies/ $5 \mu\text{l}$ になるように希釈し、これらの検体と陰性対照 (DNA/RNA-Free の精製水) について、LC cDNA 法と LC One-Step 法とを 5 回ずつ実施した。

3. LC cDNA 法および LC One-Step 法の野外検体測定結果の比較

平成 17 年 11 月から平成 18 年 6 月の間に、小児科定点等から感染性胃腸炎として搬入されロタウイルスおよびアデノウイルス感染症を否定した感染症由来検体 (42 検体)、および、食中毒由来検体 (37 検体)、計 79 検体

Table 1. Nucleotide sequences of primers and TaqMan probes used in this study

Geno/groups	Primer or probe	Nucleotide sequence	Position	Sense***
GI	Primer COG1F	5'-CGYTGGATGCGNTTYCATGA-3'	5291*	+
	Primer COG1R	5'-CTTAGACGCCATCATCATTYAC-3'	5375*	-
	Probe RING1(a)-TP	5'-FAM-AGATYGCGATCYCCTGTCCA-TAMRA-3'	5340*	-
	Probe RING1(b)-TP	5'-FAM-AGATCGCGTCTCCTGTCCA-TAMRA-3'	5340*	-
GII	Primer COG2F	5'-CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG-3'	5003**	+
	Primer ALPF	5'-TTGAGTCCATGTACAAGTGGATGCG-3'	5003**	+
	Primer COG2R	5'-TCGACGCCATCTTCATTACACA-3'	5100**	-
	Probe RING2AL-TP	5'-FAM-TGGGAGGGGATCGCRATCT-TAMRA-3'	5048**	+

* Position number of 5' end on GenBank accession no. M87661 (Norwalk/68 virus).

** Position number of 5' end on GenBank accession no. AF145896 (Camberwell virus).

*** +, virus sense; -, anti-virus sense.

Table 2. Component of *Norovirus* GI or II by LC cDNA assay and LC One-Step assay

Geno/group	Component and concentration	LC cDNA assay**	LC One-Step assay***
		Volume	Volume
GI	H ₂ O	6.6 μ l	2.6 μ l
	25 mM MgCl ₂	2.4 μ l	4.0 μ l
	Primer COG1F	10 mM	1.0 μ l
	Primer COG1R	10 mM	1.0 μ l
	Probe RING1(a)-TP	2 mM	1.0 μ l
	Probe RING1(b)-TP	2 mM	1.0 μ l
	LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe	2.0 μ l	—
	LightCycler® RT-PCR Reaction Mix HybProbe	—	4.0 μ l
	LightCycler® RT-PCR Enzyme Mix	—	0.4 μ l
	Template*	5.0 μ l	5.0 μ l
	Total	20.0 μ l	20.0 μ l
GII	H ₂ O	4.8 μ l	1.6 μ l
	25 mM MgCl ₂	3.2 μ l	4.0 μ l
	Primer COG2F	10 mM	1.0 μ l
	Primer ALPF	10 mM	1.0 μ l
	Primer COG2R	10 mM	1.0 μ l
	Probe RING2AL-TP	2 mM	2.0 μ l
	LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe	2.0 μ l	—
	LightCycler® RT-PCR Reaction Mix HybProbe	—	4.0 μ l
	LightCycler® RT-PCR Enzyme Mix	—	0.4 μ l
	Template*	5.0 μ l	5.0 μ l
	Total	20.0 μ l	20.0 μ l

* Sample for LC cDNA assay is cDNA, and sample for LC One-Step assay is extracted RNA.

** Cycling profile for LC cDNA assay consisted of 95°C for 10 min, which was followed by 45 cycles of denaturation at 95°C for 10 s, annealing at 60°C at 25 s, and elongation at 40°C for 30 s.

*** Cycling profile for LC One-Step assay consisted of 52°C for 10 min, and then 95°C for 30 s, which was followed by 45 cycles of denaturation at 95°C for 10 s, annealing at 60°C at 25 s, and elongation at 40°C for 30 s.

について、LC cDNA 法と LC One-Step 法を実施し、両方法の成績を比較した。なお、食中毒および感染症検体はふん便のまま冷蔵搬入されているため、約 1 g のふん便を感染症用検体は 9 ml の modified D-MEM で、食中毒由来検体は 9 ml の PBS(-) で懸濁したものから QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて RNA 抽出を行った。

結果および考察

1. LC cDNA 法と LC One-Step 法における GI, GII の蛍光増幅曲線、検量線・検出限界値および測定時間 (Fig. 1~4)

LC cDNA 法および LC One-Step 法による GI ならびに GII 標準 DNA の蛍光増幅曲線を、それぞれ Fig. 1 および Fig. 2 に示した。両方法ともに GII 標準 DNA の蛍光値は GI 標準 DNA のそれと比べ高値を示した。さらに、LC cDNA 法は $10^7 \sim 10^1$ copies/ 5μ l 濃度のテンプレートのすべての蛍光値は良好に上昇した。しかし、LC One-Step 法はテンプレートの標準 DNA 量が減少するにつれて蛍光値は LC cDNA 法のそれと比較し上昇していなかった。LC One-Step 法ではキャピラリー内で RNA より RT 反応で cDNA 合成後、PCR 増幅を実施

するため、反応条件が PCR 用に最適化されていないなどが本現象に関与するものと思われた。

両方法による GI および GII 標準 DNA の検量線を Fig. 3 および Fig. 4 に示した。LC cDNA 法の GI 標準 DNA の検量線は $y = -3.6922x + 43.406$ ($R^2 = 0.9994$)、GII 標準 DNA のそれは $y = -3.4097x + 38.810$ ($R^2 = 0.9912$)、LC One-Step 法の GI 標準 DNA の検量線は $y = -3.5495x + 40.715$ ($R^2 = 0.9978$)、GII 標準 DNA のそれは $y = -3.4502x + 39.250$ ($R^2 = 0.9932$) であった。両方法における GI および GII 遺伝子とともに、 $10^1 \sim 10^7$ copies/ 5μ l では良好な直線性を示し、検出限界値はいずれも 10^1 copies/ 5μ l であった。

両法ともに測定のみにかかわる時間は約 50 分であった。10 検体検査する場合、LC cDNA 法は検体からテンプレート作製まで約 5 時間を必要とするため、検体搬入から判定までに計 6 時間を、LC One-Step 法は検体からテンプレート作製まで約 1 時間、さらに試薬の調製等も含め、検体搬入から判定までに計 3 時間を要した。

2. 野外検体を用いた LC cDNA 法と LC One-Step 法の成績の比較 (Table 3, Fig. 5)

LC cDNA 法では感染症由来検体 42 検体中 22 検体

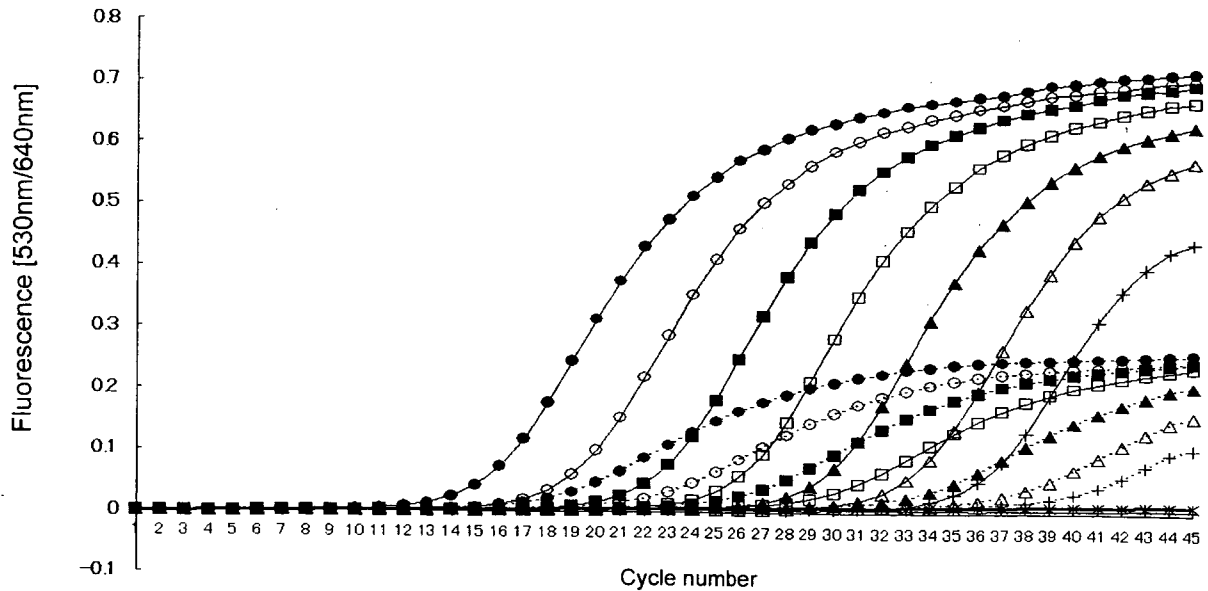


Fig. 1. Fluorescent amplification curves of *Norovirus* GI (.....) and GII (—) product using the LC cDNA assay. DNA standard samples were 10^7 (●), 10^6 (○), 10^5 (■), 10^4 (□), 10^3 (▲), 10^2 (△), 10^1 (+) copies/ $5\mu\text{l}$, and negative control (*).

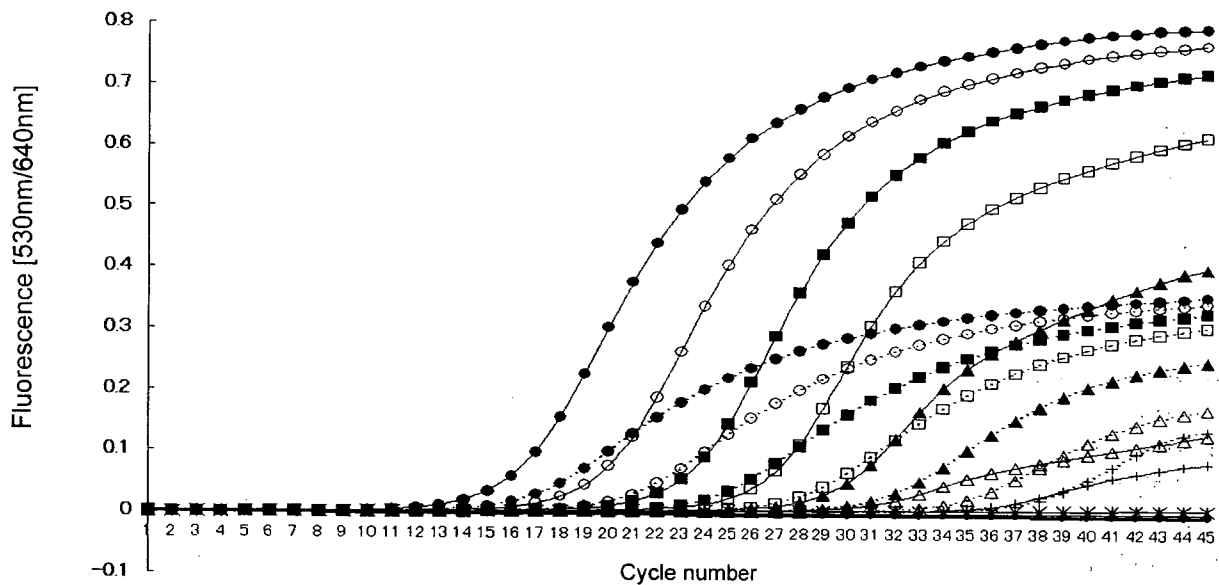


Fig. 2. Fluorescent amplification curves of *Norovirus* GI (.....) and GII (—) product using the LC One-Step assay. DNA standard samples were 10^7 (●), 10^6 (○), 10^5 (■), 10^4 (□), 10^3 (▲), 10^2 (△), 10^1 (+) copies/ $5\mu\text{l}$, and negative control (*).

から、食中毒由来検体 37 検体中 27 検体から、NV 遺伝子が検出された。食中毒検体由来の 1 検体のみが GI で、ほかはすべて GII であった。この成績は LC One-Step 法によるものと完全に一致した。よって、LC cDNA 法と LC One-Step 法は特異性および検出感度において同等であることが確認された。国立感染症研究所発行「病原微生物検出情報」(<http://idsc.nih.go.jp/iasr/virus/virus-j.html>)の平成 17 年 11 月から平成 18 年 6 月の統計においても、NVGI が 440 件、GII が 2491 件と GII の検出が多くなっており、今回の供試検体において GII

の検出が多かった理由として、日本全国において GII による感染症や食中毒が蔓延していることを反映したものと思われた。

LC cDNA 法および LC One-Step 法による感染症由来検体テンプレート中の遺伝子の幾何平均コピー数はそれぞれ 3.2×10^5 cDNA copies/ $5\mu\text{l}$ ならびに 6.6×10^5 RNA copies/ $5\mu\text{l}$ 、食中毒由来検体テンプレートのそれは、それぞれ 8.8×10^4 cDNA copies/ $5\mu\text{l}$ ならびに 1.8×10^5 RNA copies/ $5\mu\text{l}$ であった。LC One-Step 法による遺伝子の幾何平均コピー数は LC cDNA 法のそれと比

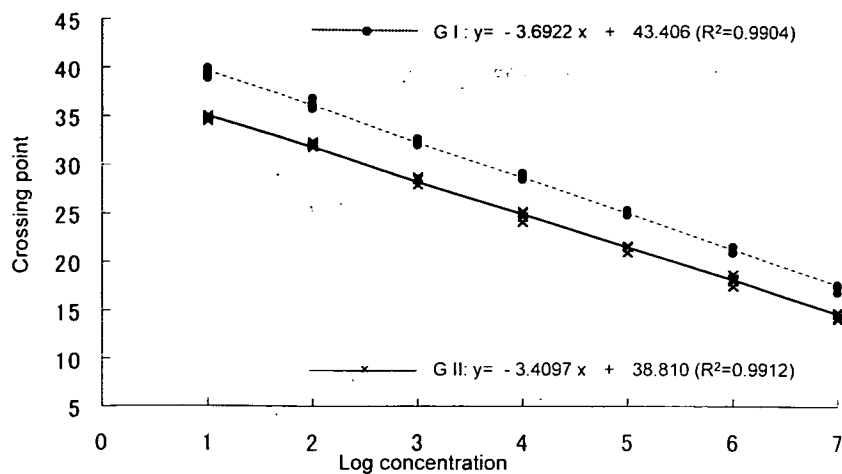


Fig. 3. Log concentration and crossing point of *Norovirus* GI and GII using the LC cDNA assay ($n=5$).

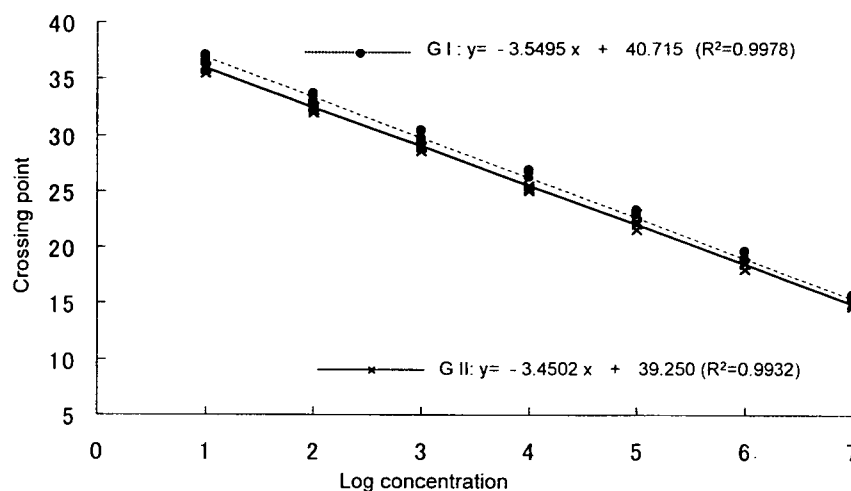


Fig. 4. Log concentration and crossing point of *Norovirus* GI and GII using the LC One-Step assay ($n=5$).

Table 3. Results of field samples using the LC cDNA and LC One-Step assays

Origin	Sample treatment	Sample number	Results of LC cDNA assay	Sample number	Average (cDNA copies/5 μ l)	Results of LC One-Step assay		Average (RNA copies/5 μ l)
						+	-	
Fecal samples from hospital patients	10-fold dilution by modified D-MEM	42	+	22	3.2×10^5 *	22	0	6.6×10^5 *
			-	20	-	0	20	-
Fecal samples from food poisoning cases	10-fold dilution by PBS(-)	37	+	27	8.8×10^4 **	27	0	1.8×10^5 **
			-	10	-	0	10	-

* All positive samples were identified as GII.

** One positive sample was identified as GI and the other 26 positive samples were identified as GII.

べ、感染症由来検体テンプレートで 2.06 倍、食中毒由来検体テンプレートで 2.05 倍高い値を示した。LC One-Step 法はテンプレートとして抽出 RNA を、LC cDNA 法は cDNA を用いており、cDNA 合成過程で抽出 RNA は約 2.5 倍に希釈されている。LC cDNA 法と LC One-Step 法のテンプレートの遺伝子数の差は両方法のテンプレートの希釈割合や DNA 合成酵素の合成効率の差などによるものと考えられた。

LC cDNA 法と LC One-Step 法のテンプレート中の

遺伝子数の相関は、感染症由来検体では $y=1.0064x-0.3473$ ($R^2=0.9610$)、食中毒由来検体では $y=0.9627x-0.1034$ ($R^2=0.9888$) であり、良好な相関を示した (Fig. 5)。

最近、NV 感染症がわが国を含め全世界で大流行している⁶⁾。また、NV は感染症、食中毒の原因ウイルスとして重要であり、防疫対策や行政処分を講じるために、衛生研究所等での検査の需要が増加している。LightCycler[®] を用いた LC cDNA 法および LC One-

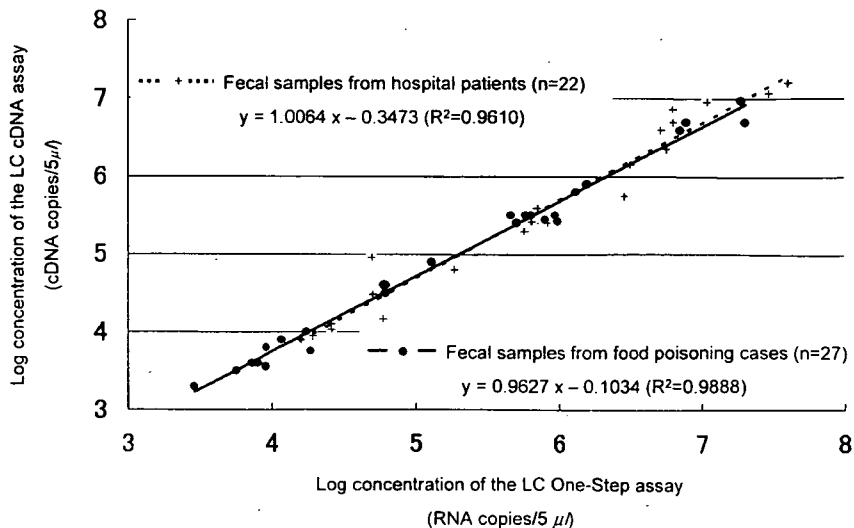


Fig. 5. Correlation analysis between copy numbers of the LC One-Step and LC cDNA assays.

Step 法は NVGI, GII を迅速に検出するための方法として有効であると思われた。特に LC One-Step 法は検体搬入から約 3 時間で結果が判明することから、有益な方法であると思われた。

謝 辞

本研究の一部は、(独)科学技術振興機構、平成 17 年度 群馬県地域研究開発促進拠点支援 (RSP) 事業：研究成果育成型の「食品と水に含まれる有害微生物の迅速高感度遺伝子検出法の確立」により実施されたものである。さらに、本研究を実施するにあたり、有益な助言を頂いた新美真一先生 ((株)日本遺伝子研究所)、宮崎 愛先生、山城 亮先生、宮崎春香先生 (以上、ロッシュ・ダイアグノスティックス(株)) に深謝する。

文 献

- 1) Goodgame, R.: Norovirus gastroenteritis. *Curr. Gastroenterol. Rep.*, **8**, 401-408 (2006).
- 2) Kapikian, A. Z., Wyatt, R. G., Dolin, R., Thornhill, T. S.,

- Kalica, A. R. and Chanock, R. M.: Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J. Virol.*, **10**, 1075-1081(1972).
- 3) Kojima, S., Kageyama, T., Fukushi, S., Hoshino, F. B., Shinohara, M., Uchida, K., Natori, K., Takeda, N. and Katayama, K.: Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *J. Virol. Methods*, **100**, 107-114 (2002).
- 4) 厚生労働省医薬品食品局食品安全部監視安全課長：ノロウイルス検出法について。平成 15 年 11 月 5 日，食安監発第 1105001 号 (2003).
- 5) 西尾 治，秋山美穂，愛木智香子，杉枝正明，福田伸治，西田知子，植木 洋，入谷展弘，篠原美千代，木村博一：ノロウイルスによる食中毒について。日食衛誌，**46**，235-245 (2005).
- 6) Siebenga, J. J., Vennema, H., Duizer, E. and Koopmans, M. P.: Gastroenteritis caused by norovirus GGII. 4, The Netherlands, 1994-2005. *Emerg. Infect. Dis.*, **13**, 144-146 (2007).

<特集関連情報>

調理従事者からノロウイルスが検出された食中毒事例—愛媛県

近年、ウイルス性胃腸炎の集団発生は増加傾向にあり、食中毒では非カキ関連の事例や、施設内における人→人感染による事例が増大している。これらの事例は、ノロウイルス (NV) 感染による発生が大半を占めており、食中毒事例の多くが食品の二次汚染によって生じた集団発生と推定される。事例ごとの、現場における感染経路の究明と発生要因の特定は、その後の感染拡大の防止あるいは発生予防を図る上で、極めて重要であると思われる。また、集団発生の背景には、地域内の散発性胃腸炎の流行があり、流行ウイルスの関与が大きな発生要因となっている。今回、愛媛県内で発生したウイルス性食中毒事例のウイルス検索の結果、患者糞便と併せて調理従事者糞便、一部の食品およびふきとり調査検体から NV を検出した事例について、感染経路の究明および発生要因の推測のため、検出ウイルスの遺伝子解析を行った。また県内の散発性胃腸炎からの検出ウイルスと、食中毒事例の原因ウイルスとの関連性を検討した。

ウイルス検索は、電子顕微鏡と PCR を併用し、NV の検出にはリアルタイム PCR¹⁾を用いた。NV 陽性例は、ダイレクトシークエンスで構造蛋白領域の塩基配列を決定し、遺伝子型別を行った²⁾。一部の NV のシークエンスは、国立感染症研究所の西尾博士、木村博士に依頼して行った。糞便材料は、2004年1月～2006年12月の間の、散発性胃腸炎患者1,396名、胃腸炎集団発生の患者563名の便を用いた。

愛媛県内で、調査期間中に発生した食中毒事例数を表1に示した。全国の発生状況と同様の傾向で、NV による発生が急増し、2006年には全事例数20のうち半数の10事例が NV を原因とするものであった。18事例のうち、カキ関連の食中毒は2004年に飲食店で発生の1事例のみで、発生施設は飲食店8、旅館・ホテル等4、福祉施設、学生寮、家庭での発生が各2事例であった。これらのうち、調理従事者便からもノロウイルスが検出された11事例を次ページ表2に示した。規模の大きかったのは事例4、6、10、11で、それぞれ74人、100人、63人、246人の発症者がでた。調理従事者の中で、発症者が確認されたのは事例3、4、9、11の4事例(表2の括弧内はその人数)で、残り7事例ではいずれも症状を示さない不顕性感染者のみであった。また、調理従事者便から検出された NV の量は、患者便からの NV 量に比較してほとんどの事例で大差はなく、非発症者であっても患者と同等量のウイルスを

表1. 愛媛県内で発生した食中毒事例(2004.1～2006.12)

年 別	2004	2005	2006	計	
全事例数	23	27	20	70	
NVIによる 事例数	カキ関連	1	—	—	1
	非カキ関連	4	3	10	17

排泄していた。事例1においては、非発症の調理従事者A、B、Cの3名について NV の追跡調査を実施した。A (初回 NV 量 2.0×10^3 copies/g) は、7日経過後の便からは NV は検出されなかった。しかし B (1.6×10^9 copies/g)、C (3.0×10^9 copies/g) では9日経過後にもそれぞれ 4.2×10^5 copies/g、 7.6×10^4 copies/g の NV が検出され、不顕性感染者も患者と同様に、大量のウイルスを一定期間排泄していることが確認された。調理従事者が高率に NV を保有している事例が多い理由として、食中毒発生の原因食品を賄い食として喫食したか否かは不明確で、人→人あるいは施設などを介しての感染も考えられた。特に事例9および事例11においては、ふきとり調査でそれぞれの従事者専用トイレの手洗いカラン、取っ手、便器から NV が検出されており、施設を介して調理従事者間に感染が拡大したことが推察された。事例1および事例11では、原因食と想定された食品(付け合せ野菜、マカロニサラダ、卵とじ、スパゲッティ、切干煮物、もやし和え物)から NV が検出され、それらの NV 量は $6.3 \times 10^3 \sim 1.1 \times 10^4$ copies/g の範囲(平均 3.5×10^3 copies/g)であり、ヒトに感染を起こすのに十分なウイルス量の汚染が認められた。11事例から検出された NV の遺伝子解析により患者、調理従事者、食品、ふきとり検体からの NV の塩基配列は、それぞれ事例ごとに相互に高い相同性を示し、食中毒発生における調理従事者の関与が推察された。

散発性胃腸炎からは、3年間に NV が397例検出され、GIとGIIの比率はおよそ1:9であった。食中毒発生と同時期の散発例から得られた NV には、食中毒事例の NV の塩基配列と100%一致または、非常に高い相同性を示すウイルスが存在し、集団発生との密接な関連性が示唆された。

2006年に、県内の食中毒事例および散発性胃腸炎から検出された NV の遺伝子型は、その大部分が GII/4 型であり、これらはさらに3つのサブグループに解析されたが、集団例・散発例双方の NV とともに、一部を除いてほとんどが、欧米で流行している GII/4 2006 変異株³⁾と類似のウイルスであったと考えられた。このウイルスが地域内の散発性胃腸炎の大流行や、相次ぐ集団発生の要因となった可能性が大きいと思われた。

表2. 調理従事者からノロウイルスが検出された食中毒事例(2004.1~2006.12)

事例No.	発生時期	発生施設	原因食品	NV陽性数/検査数			遺伝子型
				患者	調理従事者 (有症者)	食品 ふきとり	
1	2004.2.	福祉施設	給食	9/12	5/8	3/9	GI/4
2	2004.4.	学生寮	給食	1/2	3/3		GI/4
3	2004.11.	国民宿舎	不明	2/2	3(3)/7(6)		GI/1
4	2004.12.	飲食店	不明	14/16	1(1)/4(1)		GI/6
5	2005.1.	飲食店	弁当	11/11	5/6	0/5	GI/4
6	2005.12.	旅館	会席料理	13/15	8/20		GI/8
7	2005.12.	飲食店	弁当	4/6	2/2		GI/4
8	2006.10.	飲食店	会食	6/6	1/3		GI/4
9	2006.11.	福祉施設	給食	9/9	1(1)/2(1)	2/10	GI/4
10	2006.12.	飲食店	弁当	10/11	3/6		GI/4
11	2006.12.	飲食店	食堂・弁当	10/11	14(1)/15(1)	3/12 1/11	GI/4

食中毒事例の原因食品は、2003年以降非カキ関連の食品が多くを占めるようになり、原因食品の特定が難しく原因不明事例が増えている。また、ヒト由来NVによる食品の二次汚染の事例では、感染者数が多く大規模な事件になる傾向が強い。これらの原因究明や感染拡大の防止のために、食品中など少量のウイルスを感度良く検出できる検査法の開発が待たれる。

参考文献

- 1) Kageyama T *et al.*, J Clin Microbiol 41: 1548-1557, 2003
- 2) 片山和彦, IDWR 6 (11): 14-19, 2004
- 3) CDC, MMWR 56 (33): 842-846, 2007

愛媛県立衛生環境研究所

近藤玲子 市川高子 大塚有加

大瀬戸光明 井上博雄

西条保健所 山下育孝

食肉衛生検査センター 豊嶋千俊

国立感染症研究所

秋山美穂 木村博一 西尾 治