

愛知県内の下水処理場流入下水からのノロウイルスとサポウイルスの検出状況

分担研究者 小林慎一 (愛知県衛生研究所 微生物部)
協力研究者 川口まり子、山下照夫、皆川洋子
(愛知県衛生研究所 微生物部)

研究要旨 下水中の腸管感染ウイルスの消長を把握する目的で、愛知県内の下水処理場の流入下水から腸管感染ウイルスの検出を試みた。2006 年 6 月から 07 年 6 月までの毎週 1 回の計 55 回採水された流入下水について、RT-PCR 法でノロウイルス (NV) とサポウイルス (SaV) の検出検査を実施した結果、GI 型 NV は下水検体から調査期間を通じて高頻度に検出されたが、感染性胃腸炎患者や集団発生事例からの検出頻度は低いウイルスであった。GII 型 NV 及び SaV は下水検体からヒトの流行時期とほぼ一致して検出された。

A. 研究目的

腸管感染ウイルスの感染環の一つとして、ヒト腸管内で増殖したウイルスが糞便中に排泄された後、下水から河川を経て海へと流れて行き、海洋に生息するカキ等の二枚貝に取り込まれた後、ヒトに喫食されることで再び感染することがあると想定されている。このようなウイルス感染環の中で、下水処理場は、腸管感染ウイルスの制御に重要な役割を果たしていると考えられる。下水には、ヒトの糞尿が流入していることから、特定地域の下水から検出されるウイルスは、地域流行を反映するウイルスの指標となることが想定される。

そこで、下水中の腸管系ウイルスの消長を把握する目的で、愛知県内の下水処理場の流入下水からノロウイルス (NV) とサポウイルス (SaV) の遺伝子検出を試み、感染症動向調査事業や胃腸炎集団発生事例の患者からのウイルス検出状況と比較検討した。

B. 研究方法

1. 流入下水の採取期間

愛知県内の下水処理場 (1 箇所) で、2006 年 6 月から 07 年 6 月までの毎週 1 回の計 55 回流入下水を採取した。

2. 検査方法

流入下水 30ml をポリエチレングリコールで濃縮後、0.2%BSA を含む Veal

Infusion Broth 溶液で懸濁し、10 倍濃縮の披検試料とした。

被検試料から RNA 抽出キット (Roche 社製) で RNA を抽出後、RT-PCR 法で NV と SaV の検出検査を実施した。

NV の検出には、構造タンパク領域の一部を増幅する プライマーを用いて nested RT-PCR を行なった。GI と GII の 1stPCR 用プライマーとして、それぞれ、GIFa (5' -CGYTGGATGCGBTTYCATGA-3')/GIRv (5' -CCMACCCADCCATTRTACATYTG-3')と GIIFa (5' -CAAGARBCVATGTTTCAGRTGGATGAG-3')/GIIRv (5' -GCATAMCCRTTRTACATTCT-3')を使用し、2ndPCR 用として、GIFb (5' -TGGACAGGRGATCGCRATCT-3')/GIRv と GIIFb (5' -TGGGA GGGCGATCGCAATCT-3')/GIIRv を使用した。

SaV の検出は、Okada らの報告 (Arch. Virol. 151:2503-9. 2006) に従い、F13/14 と R13/14 (1stPCR 用) 及び F22/R2 (2ndPCR 用) のプライマーを用いた Nested RT-PCR を実施した。

ウイルス陽性バンドを認めた PCR 産物を pGEM-T Vector を用いてクローニング後、LI-COR 社製オートシーケンサーで塩基配列を決定した。

C. 研究結果

1. NV と SaV の下水検体からの検出成績

流入下水からの NV と SaV の流入下水からの検出状況を表 1 に示した。

調査した 13 ヶ月間に採水した流入下水 55 検体のうち、NV の GI 陽性が 43 検体 (78%)、GII 陽性が 23 検体

(42%)、SaV 陽性が 16 検体 (29%) と、GI 型 NV が最も高頻度に検出された。

月別の検出状況では、GI 型が 6 月から翌年の 6 月までの毎月、また、GII 型は 10 月から翌年の 6 月にかけて検出された。SaV は 7 月と 11 月から翌年 3 月にかけて検出されたが、多くは 11 月から翌年 1 月の冬季に検出された。

下水検体の調査と同時期の臨床検体からの NV と SV の検出状況を表 2 に示した。愛知県の感染症発生動向調査事業で採取された感染性胃腸炎患者の糞便や嘔吐物の NV 検査成績は、GI 陽性の 2 検体と GII 陽性の 92 検体、計 94 検体が NV 陽性であり、また、SaV 陽性は 13 検体であった。NV 陽性の急性胃腸炎集団発生 42 事例は、すべて GII 型陽性事例であり、GI 型及び SaV が検出された集団発生事例はなかった。GI 型が下水検体から年間を通じて検出されたのに対して、臨床検体からの検出頻度は低率であった。一方、GII 型及び SaV は臨床検体からの検出時期とほぼ一致して下水検体からも検出された。

2. NV と SaV の遺伝子型

下水検体から検出された GI の遺伝子型: 検出数は、GI/1:1、GI/2:2、GI/3:3、GI/4:23、GI/5:1、GI/8:10、GI/12:2、GI/13:1、GI/15:1 の 9 遺伝子型であり、GI/4 が最も多く検出され、次いで GI/8 であった。GII については、GII/3:1、GII/4:15、GII/13:9 の 3 遺伝子型に分類された。GII/13 は 3 月末から 6 月にかけて高頻度に検出されたが、臨床検体からは検出されなかった。

図1にSaVの系統樹解析の結果を示した。下水検体由来のSaVはすべてGI型に分類された。一方、2006年に臨床検体から検出されたSaVはGIとGII分類されたが、07年にはさらにGIVに分類されるウイルスも検出された。臨床検体からは、多様な遺伝子型のSaVが検出される傾向にあるが、下水検体からは、GI型のみを検出であった。

D. 考察および結論

GI型ノロウイルス(NV)が高頻度に下水検体から検出されるのに対して、感染症発生動向調査事業で採取された臨床検体からのGI検出例は2007年1月の2検体(GI/4)のみであり、集団感染事例からの検出例はなかった。下水検体から9遺伝子型のGIが検出されたことから、ヒトの間では、多様な遺伝子型のGIが地域流行していることが推察されたが、臨床検体からの検出頻度が低い理由については不明である。一方、GII型は、06年10月以降に採取された検体から検出され始め、NVによる感染性胃腸炎の流行時期とよく一致していた。また、検出された遺伝子型も同時期の主要な流行型のGII/4であり、ヒトでの流行状況を反映する結果であった。また、07年の3月末から6月にかけて、GII/13型が高頻度に下水検体から検出されたが、臨床検体からは検出されなかった。

SaVは、感染性胃腸炎患者からの検出時期とほぼ一致して下水検体からも検出された。その遺伝子型を比較すると、感染性胃腸炎患者からはGI、GII、

GIVのSaVが検出され、ヒトの間での多様な遺伝子型の流行が推察されたが、下水検体からはGIのみを検出であった。

今後は、下水中のNVやSaVの定量的検査法を導入してウイルスの消長を定量的に解析するとともに、臨床検体からの検出状況と対比しながら調査することが必要と考えられた。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kumar S., Ochoa W., Kobayashi S., Reddy VS. Presence of a surface-exposed loop facilitates trypsinization of particles of Sinsiro virus, a genogroup II.3 norovirus. *J. Virol.* 2007;81: 1119-1128.
- 2) Hata M., Ito M., Kiyosawa S., Kimpara Y., Tanaka S., Yamashita T., Hasegawa A., Kobayashi S., Koyama N., Minagawa H. A fatal case of encephalopathy possibly associated with human metapneumovirus infection. *J. J. I. D.* 2007;60: 328-329.
- 3) 山下照夫、伊藤 雅、皆川洋子. 感染症発生動向調査におけるコクサッキーウイルス検出と臨床診断 1990年～2006年の総括(愛知県). *臨床とウイルス*, 2007;35:160-169
- 4) 山下照夫、伊藤 雅、皆川洋子. アイチウイルス感染症. *公衆衛生*, 2007; 71: 1001-1002

5) 伊藤 雅、山下照夫、皆川洋子.
ヒトパレコウイルス (Human
Parechovirus: HPeV) 感染症 Human
Parechovirus infection. モダンメデ
ィア、2007;53 : 329-336

2. 学会発表

- 1) 小林慎一、川口まり子、長谷川晶子、伊藤 雅、山下照夫、武田直和、皆川洋子：愛知県下流入下水からのノロウイルスとサポウウイルスの検出状況、第55回日本ウイルス学会学術集会、札幌市、2007年.
- 2) 柴田伸一郎、小原真弓、長谷川澄代、大矢英紀、尾西 一、東方美保、青木聡、猿渡正子、田中保和、中野陽子、杉山 明、小林慎一、皆川洋子：平成18年度の東海北陸地区におけるノロウイルスの検出状況について。第55回日本ウイルス学会学術集会、札幌市、2007年.
- 3) 山下照夫、伊藤 雅、長谷川晶子、榮 賢司、皆川洋子。海外帰国者から持ち込まれる多様なエンテロウイルスの遺伝子解析。第55回日本ウイルス学会学術集会、札幌市、2007年.

表1 流入下水からのノロウイルス及びサポウイルスの検出状況

	2006年							2007年						計	
	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	4月	5月	6月		
採水回数	4	4	5	4	4	5	4	5	4	4	4	4	4	55	
NV	GI 陽性数	4	1	4	1	2	4	4	5	3	4	4	3	4	43
	GII 陽性数					1	4	3	2		2	4	4	3	23
	SaV 陽性数		1				3	4	4		2		1	1	16

表2 臨床検体からのノロウイルス及びサポウイルスの検出状況

	2006年							2007年						
	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	4月	5月	6月	
・感染症発生調査事業														
NV	GI 陽性数							2						
	GII 陽性数					11	57	13	8	2			1	
	SaV	2	1						1			1	5	3
・胃腸炎集団発生事例														
NV	検査事例数		1	1	1	4	22	7	5	4	7	3	1	1
	GI 陽性数													
	GII 陽性数		1	1	1	3	18	6	5	2	3	2		
	SaV													

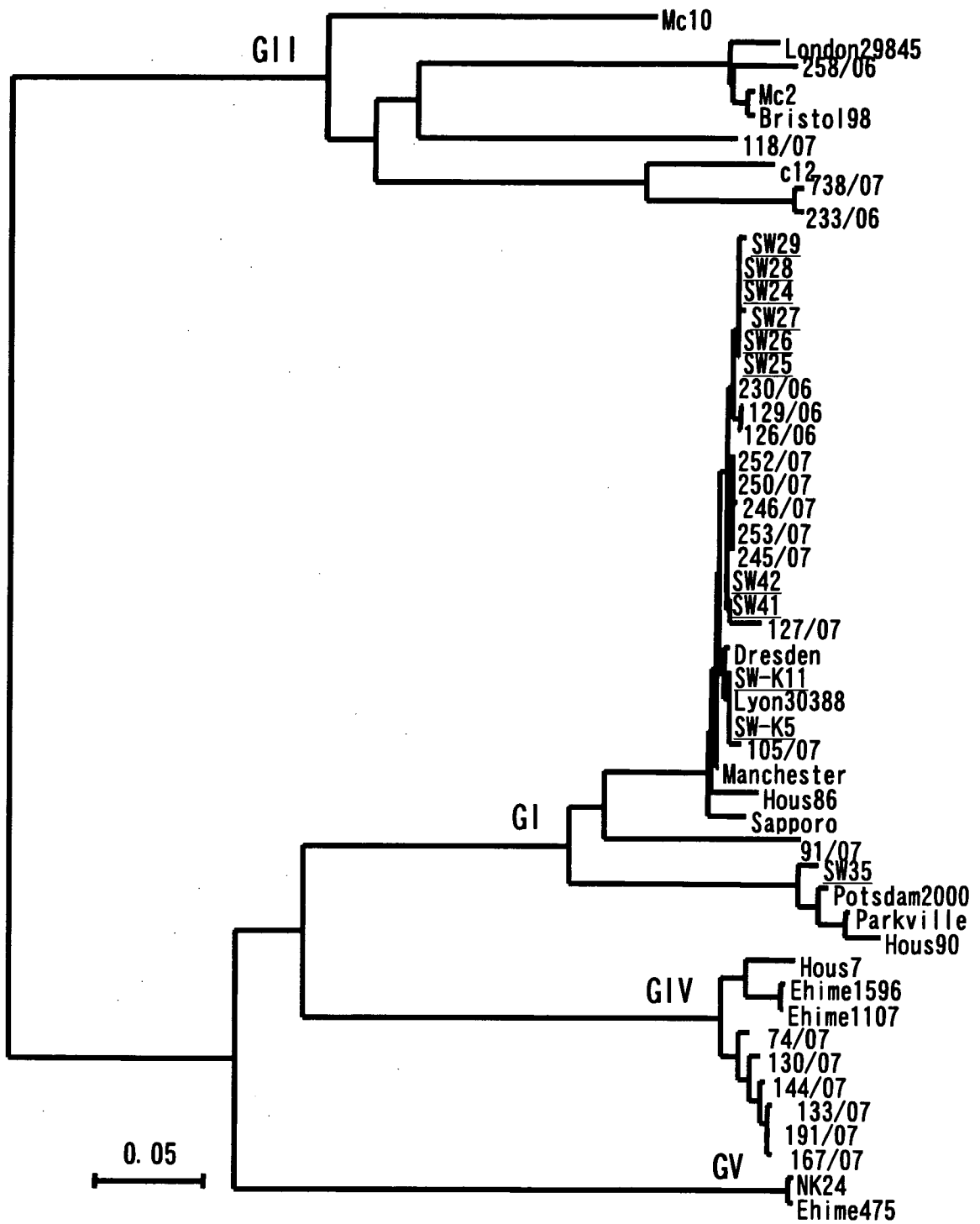


図1 サポウイルスの系統樹解析
(SW : 下水検体)

平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安心安全確保推進研究事業）
「食品中のウイルスの制御に関する研究」班
分担研究報告書

豚における E 型肝炎ウイルスの感染時期

分担研究者：恒光 裕（動物衛生研究所 ウイルス病研究チーム）

研究要旨：18 養豚場より計 24 回、肉豚発育ステージ別血清を採取して HEV 抗体検査を実施した。75% (18/24) の肉豚採材時において、120 日齢までに血清中での HEV 抗体価 (ELISA 値) の上昇が確認された。一方、6 採材時 (25%) では HEV 抗体価の上昇は 150-180 日齢まで確認されないか、150 日齢で初めて確認された。一部の採材時に糞便を併せて採取し、血清と共に RT-PCR 法により HEV 遺伝子検査を実施した。いずれの血清からも HEV 遺伝子は検出されなかった。一方、糞便中では HEV 抗体価の上昇直前ならびに上昇直後の一部材料で HEV 遺伝子が検出された。次に、8 農場より計 14 回、母豚血清を採取して HEV 抗体検査を実施した結果、母豚産歴別の HEV 抗体価は採材時間で一定の傾向は認められなかった。以上の結果より、これまでの報告と同様に豚での HEV の主要な感染月齢は 2-3 ヶ月齢と考えられること、一部の肥育末期の豚に HEV 感染が起きていること、母豚において HEV の再感染あるいは再暴露が起きていることが明らかとなった。

共同研究者

池田秀利（動物衛生研究所）
宮崎綾子（動物衛生研究所）
鈴木孝子（動物衛生研究所）
山田 学（動物衛生研究所）
服部奈千子（動物衛生研究所）

A. 研究目的

E 型肝炎は E 型肝炎ウイルス (HEV) の感染に起因するヒトの急性肝炎である。近年、豚などの動物も HEV の保有宿主であることが明らかにされ、また、加熱不十分な豚や野生動物の内臓肉などの喫食による本病の発生例が報告されたことから、動物や食品サイドからの HEV の調査研究が望まれている。本年度の研究では、日本の 18 養豚場における HEV の主要な感染日齢を血清中の HEV 抗体検査により明らかにするとともに、一部の農場において糞便ならびに血清中の HEV 遺伝子検査を実施して、出荷時の HEV 汚染リスクを検討することを目的とする。

B. 研究方法

2004-2007 年において、8 県 18 農場より計 24 回、肉豚発育ステージ別 (30 日、60 日、90 日、120 日、150 日および 180 日齢) の

豚血清各 4-5 頭ずつを採取した。一部の採材時には糞便を併せて採取した。また、8 農場より計 14 回、母豚血清を 10-20 頭採取した。これらの血清材料についてウイルス様粒子を用いた ELISA 法により HEV 抗体検査を実施した。また、一部の血清ならびに糞便材料から RNA を抽出して RT-PCR 法により HEV 遺伝子検査を行った。

HEV 抗体の測定は、Li らの報告したウイルス様粒子 (VLP) を抗原とした ELISA 法で実施し、血清材料を 200 倍希釈して使用した。なお、HRPO 標識抗豚 IgG 抗体は KPL 社の製品を用いた。

血清ならびに糞便乳剤より RNA を市販の RNA 抽出キット (TRIZOL-LS; Invitrogen) で抽出した。抽出した RNA を用いて Huang らが報告した RT-PCR 法 (J Clin Microbiol, 2002, 40:1326-1332) により HEV 遺伝子の有無を検査した。

C. 研究結果

75% (18/24) の肉豚採材時において、120 日齢までに血清中での HEV 抗体価 (ELISA 値) 平均値の上昇が確認された。一方、6 採材時 (25%) では、HEV 抗体価の上昇は 150-180 日齢まで確認されない、あるいは、150 日齢で初めて確認される結果となった

(図1)。

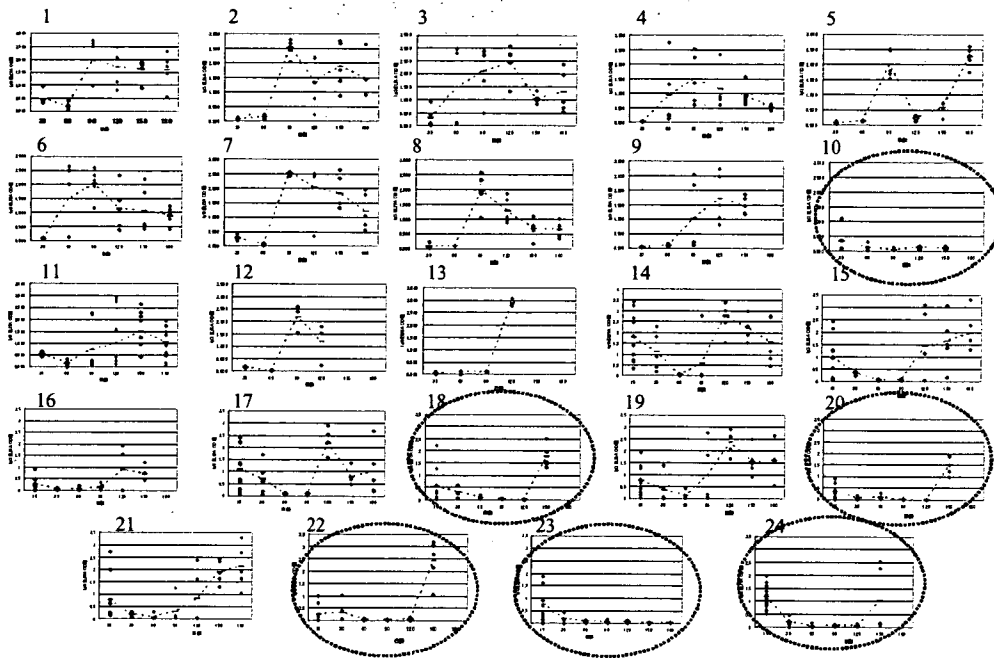


図1. 8県18農場24採材時における発育ステージ別の血清中IgG抗HEV抗体の推移

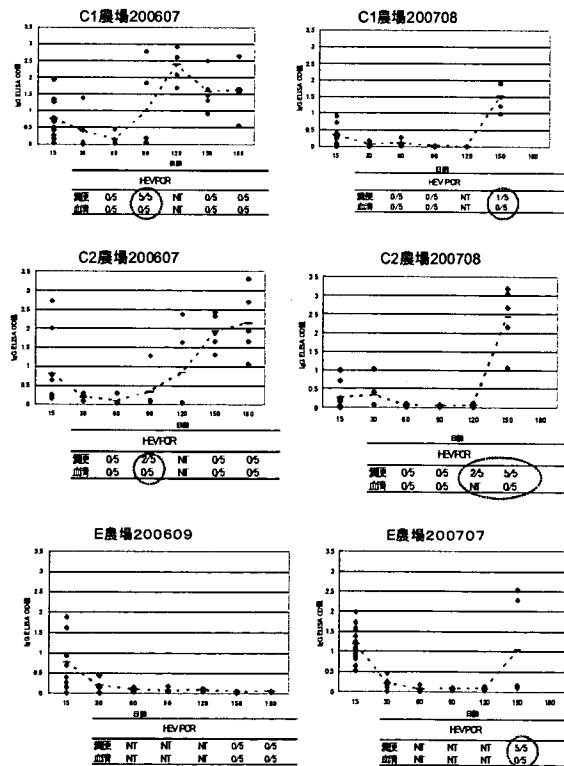


図2. 3農場6採材時における発育ステージ別の血清中IgG抗HEV抗体の推移と糞便ならびに血清からのHEV RNAの検出成績

肉豚で HEV 抗体が全く検出されなかった、あるいは、肥育期末期（150-180 日齢）に検出された 3 農場において、6 採材時での発育ステージ別血清ならびに糞便中の HEV 遺伝子の検出成績を図 2 に示した。血清中ではいずれの材料からも HEV 遺伝子は検出されなかった。一方、糞便材料においては、HEV 抗体価の上昇直前ならびに上昇直後の一部材料において、HEV 遺伝子が

検出された（図 2）。

母豚産歴別の HEV 抗体価は採材時間で一定の傾向は認められず、高産歴の母豚が高い抗体価を示す例も認められた（図 3）。11 ヶ月間隔で同じ母豚から 2 回採血した個体 4 頭中 2 頭において、HEV 抗体価の上昇（OD 値 0.2 以上の上昇）が確認された（図 4）。

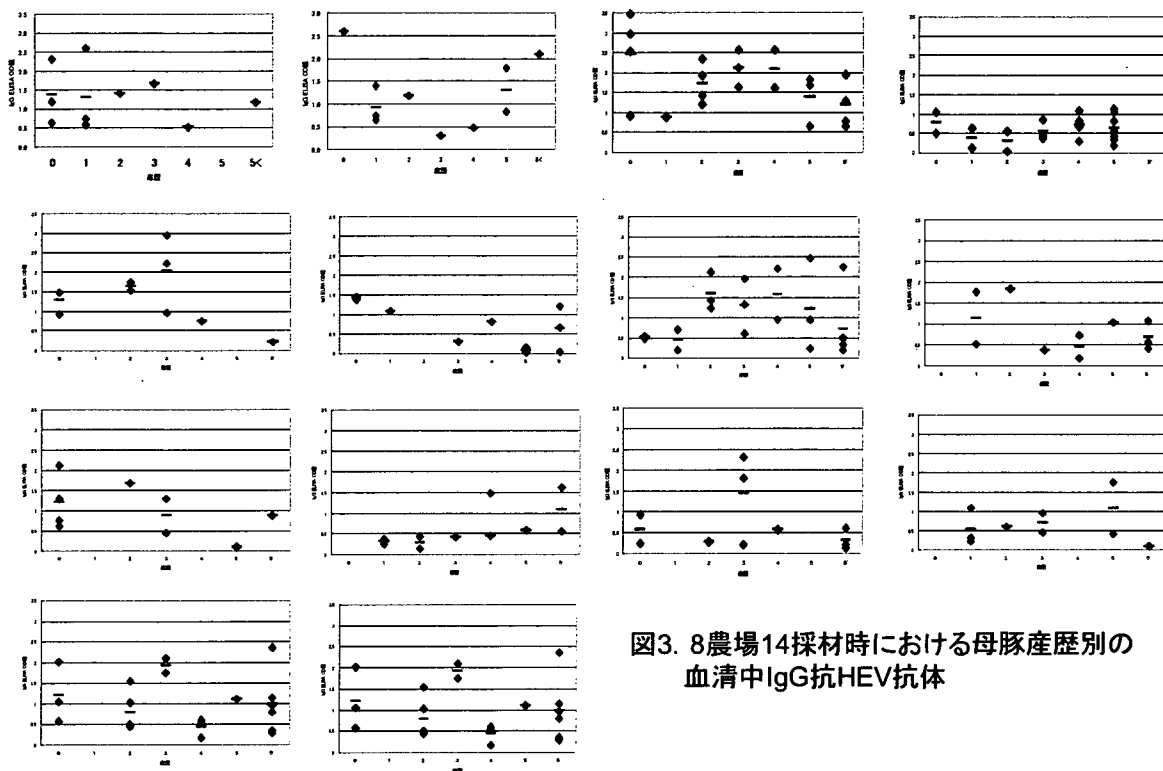


図3. 8農場14採材時における母豚産歴別の血清中IgG抗HEV抗体

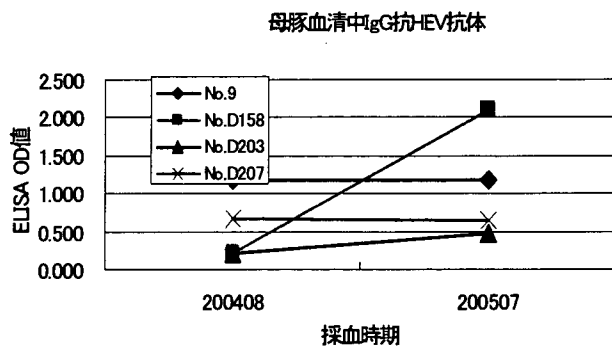


図4. 同一母豚血清中のIgG抗HEV抗体の推移

D. 考察

これまでの報告と同様、豚での HEV の主要な感染月齢は 2-3 ヶ月齢であること、また、肥育末期の豚に HEV 感染が起きている農場が存在することが明らかになった。さらに、同一農場においても HEV の感染月齢は時期により異なる場合があることも明らかとなった。肥育末期に HEV 感染が起きている豚において HEV 遺伝子は糞便から検出されたが、血清からは全く検出されなかった。このことから、過去の報告と同様に市販の豚肉中に HEV が含まれる危険性は低いと推測された。一方、糞便中から検出された HEV 遺伝子は肝臓で生成された胆汁由来と考えられ、このことは豚レバーから時に HEV 遺伝子が検出されたとする過去の成績を支持する。

母豚での HEV 抗体価は産歴が進むにつれて低下する傾向にはなく、抗体価の上昇がみられる個体も認められたことから、母豚において HEV の再感染あるいは再暴露が繰り返し起きていることが明らかとなった。

E. 結論

今回の研究によって以下のことが確認された。

1. 豚での HEV の主要な感染月齢は 2-3 ヶ月齢である。
2. 肥育末期の豚に HEV 感染が起きている農場が存在する。
3. 同一農場においても HEV の感染月齢は時期により異なる場合がある。
4. 肥育末期に HEV 感染が起きている豚において HEV 遺伝子は糞便から検出されたが、血清からは全く検出されなかった。このことから、市販の豚肉中に HEV が含まれる危険性は低いと考えられる。
5. 母豚において HEV の再感染あるいは再暴露が時におこる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

和文解説

恒光 裕. E 型肝炎. 人獣共通感染症、養賢堂 39-45, 2007.

誌上発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金 (食品の安心・安全確保推進研究事業)
「食品中のウイルスの制御に関する研究」
分担研究報告書

表面汚染が推定される食品からのノロウイルス検出法に関する検討

分担研究者：野田 衛 (国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部)

研究要旨：表面汚染が推定される食品からの簡便なノロウイルス検出法の確立を目的として、食品からのウイルスの回収に適した溶液について検討した。マグロ赤身表面にノロウイルス GII/4 を約 10^6 コピー数添加し 2 時間放置乾燥した検体に 18 種類の試験液を加え軽く混和し、一夜放置後の試験液へのウイルス回収量を調べた。最も回収率が高かった試験液は SDS Tris-Glycine、次いで 0.1% SDS 加 PBS (-) で、100% 以上の回収率を示し、対照とした PBS (-) は約 60% の回収率であった。高い回収率を示した試験液では、回収率が経時的に増加した。以上の結果から、PBS (-) の代わりに SDS Tris-Glycine あるいは 0.1% SDS 加 PBS (-) を使用することにより、食品等からのウイルスの回収率が向上する可能性があると考えられた。

A. 研究目的

ノロウイルス (NV) の食品汚染の経路は、①下水等から汚染した海水中の NV をカキ等の二枚貝が蓄養中に取り込み、中腸腺等の消化管に蓄積する、②NV に感染した調理従事者から食品が汚染される、③NV に汚染した水を介して食品が汚染される、の大きく 3 種類に分類することができるが、近年の NV 食中毒は、調理従事者を介した食品汚染を原因とする事例が多数を占めている。調理従事者から食品が汚染される経路は、調理従事者の手指から食品が直接的に汚染される場合の他、手指から食器、シンク等の調理器具、施設内の調理設備等を介して食品が間接的に汚染される場合など、様々な汚

染経路が推定されている。しかしながら汚染部位に関しては、その推定される汚染経路から、直接的、間接的な食品汚染に関わらず、食品の表面が汚染される場合が多いと考えられる。食中毒事例の原因食品として少なからず報告のある寿司はその代表的な食品である。加熱調理を伴う食品では調理後の食品の表面汚染が重要な汚染経路となり、NV に汚染した水を介しての汚染も食品の表面が汚染される場合が多いと考えられる。

一方、これまで二枚貝を除き食品からのウイルス検出例は少ない。食品からのウイルス検出は食中毒事例の特定の重要な根拠になることから、食品からの簡便・高感度なウイルス検出法

の開発が強く望まれている。食品から NV の検出を行う場合、内部汚染した食品では食品を乳剤化した後、ウイルス粒子を食品から遊離し、溶液中に回収する必要があるが、表面汚染の場合では乳剤化は必ずしも必要ではなく、表面に付着したウイルス粒子をいかに効率的に溶液に回収するかが、検出率向上の重要なポイントになると考えられる。さらに、乳剤化を行わないことは食品自体のウイルス回収液への混入を極力少なくすることになり、回収率や PCR 法などに及ぼす阻害作用の軽減の点などからも望ましいと考えられる。

本研究では、表面汚染が推定される食品からの簡便なウイルス検出法の開発を目的に、マグロ赤身からの NV の回収をモデルとして、食品からのウイルスの回収に適した溶液について検討した。

B. 研究方法

1. 各試験液による NV 回収率の比較

約 1~2g のブロックに切断したマグロ赤身に 1.03×10^6 コピー数/ $25 \mu\text{l}$ の NV (GII/4) を含む糞便遠心上清希釈液 $25 \mu\text{l}$ を添加後、室温で 2 時間放置し、添加液を乾燥させた。放置後、各赤身ブロックを 50ml 遠心管に移し、表 1 に示す試験液 10ml を加え、軽く 10 回転倒混和した後、室温で一夜放置した。再度、軽く 10 回転倒混和した後、溶液を 12ml 遠心管に移し、10,000rpm、20min、室温で遠心分離を行った。遠心上清 $70 \mu\text{l}$ から QIAamp Virus RNA

Mini Kit (Qiagen) を用いて RNA 抽出を行い、DNase 処理後、High Capacity cDNA Synthesis Kit (ABI) および Oligo dT を用いて cDNA を合成した。Kageyama らのリアルタイム PCR 法 (J Clin Microbiol, 41, 1548-1557, 2003) により cDNA $5 \mu\text{l}$ 中の NV を定量し、得られた定量値から回収液全体の NV RNA コピー数を算出し、回収率を求めた。試験液ごとに 3 回実験を繰り返し、その平均値を回収率とした。

2. 回収率の経時的変化

上記の実験で回収率が高かった SDS Tris-Glycine、0.1% SDS 加 PBS (-)、1% Tween20 加 50mM Tris (pH9.0)、1% SDS 加 PBS (-) (表 2) および対照として PBS (-)、Milli-Q 水について、回収液添加直後、2 時間後、および一夜放置後の回収量を求め、回収率の経時変化を調べた。溶出時間を除き、全て同様の方法で実施した。

C. 研究結果

1. 各試験液によるマグロ赤身からの NV 回収率の比較

NV を添加した赤身ブロックに表 1 に示す各試験液を加え、一夜放置後の回収率を調べた (表 2)。最も高い回収率を示した試験液は SDS Tris-Glycine で 119.7%、次いで 0.1% SDS 加 PBS の 101.0% で、いずれも 100% 以上の回収率を示し、以下、1% Tween20 加 Tris (pH9) 94.3%、1% SDS 加 PBS (-) 84.7% が高い傾向にあった。それら以外の試験液は 60%~80%、対照とした PBS (-) および Milli-Q 水

はそれぞれ 60.7%、41.0%の回収率であった。

SDS Tris-Glycine の回収率が 100%以上を示したことから、RNA 抽出効率の増加等の要因で見かけ上回収率が増加した可能性が考えられたので、添加 NV を Milli-Q 水あるいは SDS Tris-Glycine で 100 倍希釈し、その希釈液から RNA 抽出を行い RNA コピー数を定量した。その結果、Milli-Q 水で希釈したものは 10,631 コピー数 (実測値)、SDS Tris-Glycine で希釈したものは 10,938 コピー数で、その定量値に有意な違いは認められなかった。

2. 回収率の経時的変化

高い回収率を示した SDS Tris-Glycine、0.1% SDS 加 PBS (-)、1% Tween20 加 50mM Tris (pH9.0)、1% SDS 加 PBS (-) および対照の PBS (-)、Milli-Q 水について、回収液添加直後、2 時間後、一夜放置後の回収量を求め、回収率の経時変化を調べた。回収率が高かった 4 試験液はいずれも経時的に回収率が増加した (表 3) が、PBS (-) あるいは Milli-Q 水では、添加直後から 2 時間放置後にかけて回収率が増加したが、一夜放置後での増加は認められなかった。

D. 考察

本研究で、マグロ赤身表面に付着した NV 粒子を、SDS Tris-Glycine あるいは 0.1% SDS 加 PBS (-) を使用することにより、マグロ赤身を乳剤にすることなくほぼ 100% 溶液中に回収できることを示した。対照とした PBS (-) の回

収率は約 60% であったことから、回収率は約 1.7 倍の増加であった。

SDS を添加した他の試験液も同様に高い回収率を示したことから、SDS の存在がマグロ赤身表面からの NV 粒子の遊離に効果があるものと考えられる。また、0.1% あるいは 1% の Tween20 を添加した 50mM Tris (pH9) および PBS (-) の結果をみると、PBS (-) を 50mM Tris (pH9) に替えることで回収率が増加していることから、アルカリ条件も回収率に影響しているものと思われる。SDS Tris-Glycine の pH は 8.3 であり、SDS の存在およびアルカリ条件の両方を満たしていることから、高い回収率を示したものと考えられる。一方、50mM Tris (pH9) では特に高い回収率は得られなかったことから、アルカリ条件のみでは効果はあまり大きくはないものと思われる。

SDS Tris-Glycine が高い回収率を示した原因として、SDS の存在あるいはアルカリ条件下で、溶液からの RNA 抽出効率等が増加し、見かけ上回収率が増加した可能性が考えられたので、添加 NV を Milli-Q 水あるいは SDS Tris-Glycine で 100 倍希釈し、その希釈液から RNA 抽出を行い RNA コピー数を定量した結果、両者に有意な差は認められなかった。ことから、SDS Tris-Glycine が高い回収率を示したのは、見かけ上の定量値の増加によるものではなく、回収率そのものの増加によるものと考えられた。

添加回収実験で回収率が高かった SDS Tris-Glycine、0.1% SDS 加 PBS (-)、

1%Tween20 加 50mM Tris (pH9.0)、1% SDS 加 PBS (-)、および対象とした PBS (-)、Milli-Q 水について、回収率の経時変化を調べた結果、回収率が高かった4試験液はいずれも2時間放置と比較して、一夜放置の回収率が増加した。今回は、試験液自体のウイルスの回収能力を比較するために、攪拌、振とうなどの回収率に影響を及ぼすと考えられる物理的な作用は特に加えなかった。今後、それらの操作を行うことで、より短時間に回収率を上げることができる可能性があると思われる。

今回、添加回収実験を NV 食中毒の原因食品となっている寿司の内、一般的なマグロ赤身を使用して添加回収実験を行った。この結果が他の食品でも同様に認められるか今後詳細に検討する必要がある。また、食品以外の環境材料の拭き取り検査に際しても、環境に付着した NV をより効率的に回収し、検査に供するためには、採取液の選択が重要な要因になると考えられる。それらの検査にもこれらの試験液が適応できる可能性があり、同様に検討を加える必要がある。

E. 結論

表面汚染が推定される食品からの簡便な NV 検出法の確立を目的として、マグロ赤身に NV を添加し、ウイルスの回収に適した溶液を検索した。回収率が高かった試験液は SDS Tris-Glycine、次いで 0.1% SDS 加 PBS (-) で、いずれも 100%以上の回収

率を示し、回収率は経時的に増加した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Mamoru Noda, Shinji Fukuda, Osamu Nishio, Statistical analysis of attack rate in norovirus foodborne outbreaks. Int J Food Microbiol. 122:216-220, 2008

2. 学会発表

カキからのノロウイルス検出におけるアミラーゼ処理の有用性 (2) 第 55 回日本ウイルス学会学術総会 (札幌市)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 NV 回収試験に供した試験液

試験液	備考
Milli-Q 水	
PBS (-)	
0.1%Tween20 加 PBS (-)	
1%Tween20 加 PBS (-)	
0.1%NP40 加 PBS (-)	
1%NP40 加 PBS (-)	
0.1%TritonX 加 PBS (-)	
1%TritonX 加 PBS (-)	
0.1%SDS 加 PBS (-)	
1%SDS 加 PBS (-)	
SDS Tris-Glycine	第一化学製 (0.1% SDS、25mM Tris、192mM Glycine)
50mM Tris (pH9.0)	
0.1%Tween20 加 50mM Tris (pH9.0)	
1%Tween20 加 50mM Tris (pH9.0)	
市販酵素系漂白剤 (20ml/1L) *	過酸化水素 (酵素系)、界面活性剤 (ポリオキシエチレンアルキルエーテル) 含有、酸性
市販酵素系漂白剤 (2ml/1L) *	
市販合成洗剤 A (0.5ml/1L) *	界面活性剤 (45%アルキルエーテル硫酸エステルナトリウム)、脂肪酸アルカノールアミド、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、アルキルアミンオキシド)、溶剤、粘度調整剤、酵素含有
市販合成洗剤 B (1.5ml/1L) *	界面活性剤 (アルキルエーテル硫酸エステルナトリウム)、安定化剤含有

* : ()内は、蒸留水 1 リットルに対する各洗剤の使用量 ()

表2 マグロ赤身からのNV回収率

試験液	回収率±標準偏差 (%)	
	回収率	標準偏差
Milli-Q水	41.0	±3.6
PBS (-)	60.7	±6.8
SDS Tris-Glycine	119.7	±19.2
0.1%SDS 加 PBS (-)	101.0	±27.1
1%Tween20 加 50mM Tris (pH9.0)	94.3	±25.7
1%SDS 加 PBS (-)	84.7	±19.7
0.1%Tween20 加 50mM Tris (pH9.0)	77.0	±20.8
市販合成洗剤 A (0.5ml/1L) *	71.0	±25.4
市販酵素系漂白剤 (20ml/1L) *	70.7	±2.9
0.1%TritonX 加 PBS (-)	69.3	±11.2
0.1%NP40 加 PBS (-)	68.3	±10.8
0.1%Tween20 加 PBS (-)	66.3	±11.9
50mM Tris (pH9.0)	65.3	±23.1
1%Tween20 加 PBS (-)	64.3	±9.6
1%TritonX 加 PBS (-)	62.0	±2.6
市販酵素系漂白剤 (2ml/1L) *	59.0	±10.4
1%NP40 加 PBS (-)	58.3	±14.3
市販合成洗剤 B (1.5ml/1L) *	58.3	±10.7

* : ()内は、蒸留水1リットルに対する各洗剤の使用量 ()

表3 マグロ赤身からのNV回収率の経時変化

試験液	回収率±標準偏差 (%)		
	直後	2時間後	一夜後
SDS Tris-Glycine	76.5±6.2	104.7±19.6	124.2±17.6
0.1%SDS 加 PBS (-)	73.8±12.6	97.1±12.4	105.1±20.5
1%Tween20 加 50mM Tris (pH9.0)	47.7±10.0	68.4±16.5	102.4±21.1
1%SDS 加 PBS (-)	48.2±9.1	61.8±8.5	87.3±12.8
PBS (-)	68.3±9.3	79.5±15.1	67.5±10.5
Milli-Q水	24.8±11.5	54.3±11.9	44.2±7.0

分担報告書

臨床検体での HAV RT-LAMP 法

分担研究者：米山徹夫（感染研、ウイルス第二部）

共同研究者：下池貴志、清原知子（感染研、ウイルス第二部）

嶋崎典子（感染研、バイオセーフティー管理室）

研究協力者：

藤原慶一（千葉大医学部）

柴田真一郎（名古屋市衛生研究所）

大内良美、長谷川嘉子（滋賀県衛生研究所）

山下照夫（愛知県衛生研究所）

研究要旨：

A 型肝炎患者の糞便または血清材料を使用して、A 型肝炎ウイルス (HAV) のリアルタイム RT-LAMP (Reverse transcription-Loop amplification assay) 法の evaluation を行った。その結果、HAV RT-LAMP 法は、定量性に欠けるが、臨床検体の検出感度では市販のリアルタイム RT-PCR 法と遜色ない事が明らかとなった。

A. 研究目的

前年度、細胞馴化株を用いて、HAV のリアルタイム RT-LAMP 法を確立したことを報告した。今年度は A 型肝炎患者の糞便または血清材料を使用して、その evaluation を行った。

B. 材料と方法

A 型肝炎患者糞便 26 検体、または血清 16 検体、計 42 検体を使用した（表

1）。

検体 140 μ l から QIAamp Viral RNA kit (QIAGEN) で HAV RNA を 60 μ l に抽出した。RT-LAMP 法と市販のリアルタイム RT-PCR 法 (LightCycler, Roche の HAV 定量キット) と検体中の HAV RNA の検出効率を比較した。HAV RT-LAMP 法の検量線は IA 型の HAV031 細胞馴化株から抽出したウイルス RNA を 10 倍の階段希釈で作成した。

C. 研究成果

IA型のHAV031細胞馴化株から抽出したウイルスRNAをHAV RT-LAMP法の検量線の作成に使用した。RocheのHAV定量キットのスタンダードを参照して、RT-LAMP法の検量線を作成した(図1)。RT-LAMP法の定量域は100コピー/5 μ l以上でRocheのHAV定量キットとほぼ同等であった。

検出率を比較すると両者でほぼ同等の陽性検出率であった(表2)。非常に低い濃度の検体では陽性陰性の判定結果が一致しない場合がみられた。検出率は同等なのにRT-LAMP法では、市販のリアルタイムRT-PCR法に比べ、20-100倍コピー数が高く算出された(表3)。

D. 考察

A型肝炎患者からの42検体を使って、HAV RT-LAMP法のHAV RNA検出効率を調べた。市販のLightCyclerを使用したリアルタイムRT-PCR法とRT-LAMP法は、ほぼ同等の成績が得られた。

検出率はほぼ同等なのにRT-LAMP法では、市販のリアルタイムRT-PCR法に比べ、20-100倍コピー数が高く算出される。理由は不明であるが、RT-LAMP法では検体中のHAVが低濃度(100コピー/5 μ l)から中濃度(10,000コピー

/5 μ l)のところ、実際より高くコピー数が算出されてしまうことが観察された(未発表データ)。その他に、検体により糞便検体中のインヒビターが、市販のリアルタイムRT-PCR法の検出系に影響することがあるのも一因のようである。

HAVのRT-LAMP法は検出感度には問題がないが、定量性に問題が残ることが分かった。

E. 結論

定量性には問題性があるが、HAV RT-LAMP法は62.5 $^{\circ}$ Cの等温でかつ60分で反応が終了し、結果を肉眼(濁度)で判別できるので、フィールドでの迅速検査に有効であることが確認できた。

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Yoneyama T, Kiyohara T, Shimasaki N, Kobayashi G, Ota Y, Notomi T, Totsuka A, Wakita T: Rapid and real-time detection of hepatitis A virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. *J. Virological Methods* 2007;145:162-168.

2. 学会発表

(1) 嶋崎典子、清原知子、戸塚敦子、梅森清子、岡田義昭、米山徹夫：加熱および加圧によるA型肝炎ウイルスの不活化-株間の差異の検討- . 第55回日本ウイルス学会、札幌、2007年10月

(2) 清原知子、戸塚敦子、米山徹夫、脇田隆字：A型肝炎ワクチンの接種回数と抗体価の基礎的検討. 第55回日本ウイルス学会、札幌、2007年10月

(3) 清原知子、佐藤知子、米山徹夫、戸塚敦子、脇田隆字：A型肝炎ワクチンの2回接種による抗体価の推移. 第11回日本ワクチン学会、横浜、2007年12月

H. 知的財産権の出願、登録状況
特になし。

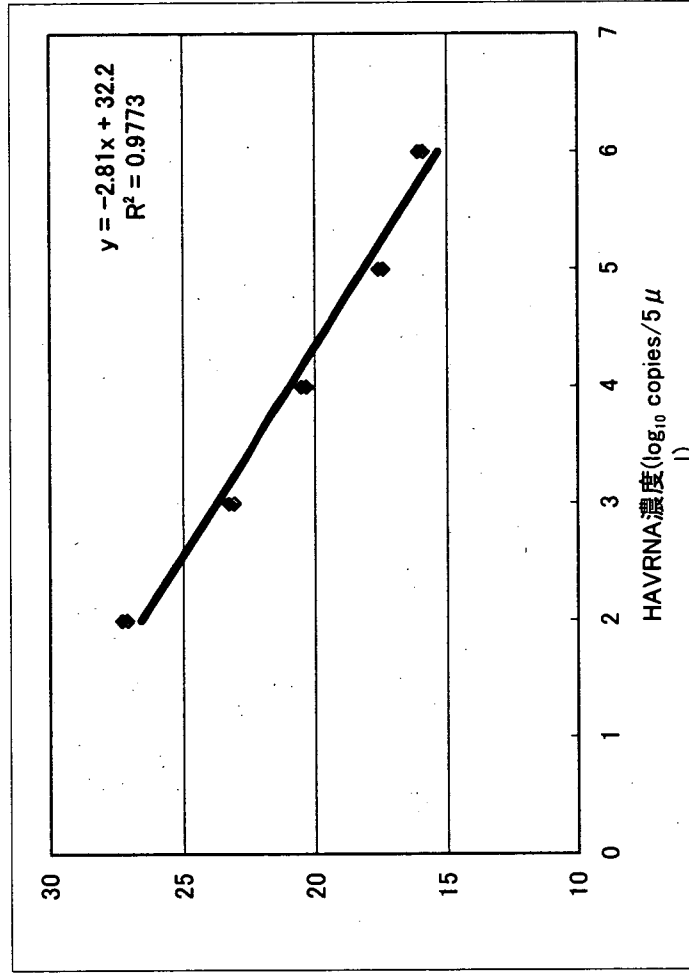


図1 HAV RT-LAMP法の検量線
 検量線はIA型のHAV031株から抽出したウイルスRNAを希釈して作成した。