

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」

協力研究報告書

パンソルビン・トラップ法による食品検体からのノロウイルスの回収(検討 2)

研究協力者 東方美保 (福井県衛生環境研究センター・保健衛生部)

分担研究者 田中智之 (堺市衛生研究所)

研究要旨:

食品検体からノロウイルス(NV)を検出するための実践的な濃縮法として、斎藤らにより新規に開発されたパンソルビン・トラップ法(パントラ法)について検討を行った。NV陽性糞便により高濃度で汚染させたモデル食品(7種の惣菜)について、PEG沈殿法で濃縮した場合と比較したところ、パントラ法による回収結果がより安定しており、操作的にも簡便で多検体処理に適しており労力的負担が軽かった。より低濃度での汚染モデル食品(2種の惣菜)からの回収では、PEG沈殿法の成績がまさる傾向が見られたものの、回収効率に影響を及ぼす因子の検討次第でさらなる改善が必要と考えられ、実用化の可能性の高い有望な濃縮法と期待される結果であった。

A. 研究目的

ノロウイルス(NV)を原因物質とする食中毒検査において、推定原因食品からのウイルス検出が切望されている。しかし、効率的な濃縮法が存在しない現状では、多大な労力と時間をかけても、食品表面からのウイルス洗滌回収が比較的容易な品目である場合や、高度に汚染されている場合などにおいてのみ検出が可能という状況である。この事態を打開するべく、斎藤らによって開発されたパンソルビン・トラップ法(パントラ法)を用いて、汚染させた食品からのNV検出を試み、実用化に向けての検討を行った。その際、現行の食品検査で汎用されて

いるPEG沈殿法による濃縮を並行して行い、比較対象とした。

B. 研究方法

1. 研究材料

汚染実験に用いる食品としては、市販されていた7種の惣菜(ナポリタン、マカロニサラダ、ポテトサラダ、まぐろ刺身、ひじき煮付、切り干し大根煮付、もやし和え物)を用いた。また、検出対象NVとして、2006年12月に福井市で発生した集団発生事例で搬入されたNV陽性糞便(GII/4)を用いた。

2. 方法

1) NV陽性糞便による食品の汚染

NV陽性糞便を蒸留水(DW)で乳剤と

し、その遠心上清を、汚染用 NV 原液とした。①この汚染用 NV 原液を 7 種の総菜の各食品 20g あたり 140 μ L 加えて汚染させた。また、②汚染用 NV 原液について 10 倍階段希釈で、10 \cdot 100 \cdot 1,000 \cdot 10,000 倍希釈液を作成し、2 種の総菜（ナポリタン、マカロニサラダ）を各濃度の希釈液で同様に汚染させた。

2) 汚染食品からのウイルス濃縮

汚染させた食品 20g 分に、0.1%の Tween20 を含む PBS (-) を洗滌液として 100mL 加え懸濁させた後、3,000rpm 20 分間の遠心操作で上清を分取した。この上清液を二分し、一方をパントラ法で、他方を PEG 沈殿法で濃縮した。

パントラ法の手順は、別稿(検討 1)の通り行った。すなわち、汚染食品の遠心上清液 50mL に、抗 GII/4 血清[感染研で VLP から作成したもの(ロット No.: 抗 104 ウサギ 971222、ホモ抗体価: 100 万倍)]を 10 μ L 加えて 37 $^{\circ}$ C で 30 分インキュベートした。その後 PANSORBIN Cells (和光純薬; #501-43261)を 300 μ L 加え、さらに 37 $^{\circ}$ C で 30 分インキュベートし、3,000rpm で 20 分遠心した沈殿を、DW で懸濁して 100 μ L 分の RNA 抽出用サンプルとした。

PEG 沈殿法については、汚染食品の遠心上清液 50mL に PEG6000 を 4.00g、NaCl を 1.05g 加え、振とうして完全に溶解させた後、4 $^{\circ}$ C で一晩放置し、8,500 \times g で 90 分遠心した沈殿を、DW で懸濁して 100 μ L 分の RNA 抽出用サンプルとした。

3) RNA 抽出

パントラ法によって濃縮した RNA 抽出用サンプルは、TRIzol-LS (invitrogen)を用いて抽出した RNA を、RNeasy Mini kit (QIAGEN)の DNase I 処理を含むプロトコールで精製した。

PEG 沈殿法で濃縮した RNA 抽出用サンプルの場合、①汚染用 NV 原液で汚染した 7 種の総菜の場合は、パントラ法による濃縮サンプルと同じプロトコールを用いた。②10 倍階段希釈した NV 液で汚染した 2 種の総菜の場合は、QIAamp Viral RNA Mini kit (QIAGEN)で RNA を抽出した。

なお、RNA 抽出法の違いによる回収への影響を算出する基準とするために、食品汚染に用いた汚染用 NV 液 70 μ L 分を、希釈濃度ごとに分取し、DW70 μ L を加えて QIAamp Viral RNA Mini kit (QIAGEN)により抽出して RNA を得た。

いずれのプロトコールも最終段階で、カラムに吸着させた RNA を溶出させるが、その際加える溶出液は 60 μ L に統一した。

4) 逆転写反応

10 μ L 分の RNA を用い、Random 9mer による逆転写で 20 μ L の cDNA を得た。なお、QIAamp Viral RNA Mini kit (QIAGEN)で抽出した RNA は、逆転写の前に DNase I 処理を行った。

5) コピー数の測定

Kageyama ら (J Clin Microbiol. 2003;41; 1548~1557)のリアルタイム PCR 法によって NV のコピー数を測定した。アプライドバイオシステム製

「ABI PRIZM 7900HT」を使用し、cDNAを2 μ L/well（反応容量20 μ L）用いてduplicateで反応を行った。

C. 研究結果

1. 汚染用 NV 原液で汚染した食品 (7 種) からの回収実験

増幅曲線は図 1~8 に示した。ひじき煮付を除く 6 種の食品と食品なしの場合に NV が検出された。RNA1 μ L あたりの実測値は、パントラ法の場合 3.818E+04~1.918E+05 コピー/ μ L と安定していたが、PEG 沈殿法の場合は、4.608E+01~1.591E+05 コピー/ μ L とばらつきが見られた (表 1)。濃縮法別での増幅曲線 (図 9) を参照すると、特にパントラ法の場合にはマカロニサラダ以外の検出可能食品 5 種 (ナポリタン、ポテトサラダ、まぐろ刺身、切り干し大根煮付、もやし和え物) の増幅曲線はほとんど一致しており、この実験系での回収飽和に達している可能性も考えられた。パントラ法と PEG 沈殿法の両方で実測値がとびぬけて高くなったマカロニサラダについては、増幅曲線の立ち上がり方が早く、抽出 RNA に混入して持ち込まれた夾雑物がリアルタイム PCR 反応系に影響を及ぼし、見かけ上高い実測値がはじきだされたのかもしれない。

2. 汚染用 NV 原液の 10・100・1,000・10,000 倍希釈液で汚染した食品 (2 種) からの回収実験

汚染用 NV 原液による汚染食品からの回収において、パントラ法の結果がまさった食品 3 種 (ナポリタン、ポテ

トサラダ、まぐろ刺身、もやし和え物) の代表としてナポリタンを、PEG 沈殿法の結果がまさった食品 2 種 (マカロニサラダ、切り干し大根煮付) の代表としてマカロニサラダを、それぞれ選択し、汚染レベルを低くした場合の回収実験結果を、表 2 に示す。高レベル汚染でパントラ法の結果がまさったナポリタンは、10・100・1,000 倍希釈液での汚染の場合、PEG 沈殿法より高い実測値が得られた。しかし、10,000 倍希釈液での汚染の場合には、PEG 沈殿法より低い値となった。マカロニサラダは 10・100・1,000・10,000 倍希釈液での汚染いずれの場合でも PEG 沈殿法が高い実測値を示した。

汚染レベルを低くした場合、全体的に、PEG 沈殿法で濃縮し QIAamp Viral RNA Mini kit で RNA 抽出を行った検体グループが好成績だった。しかし、濃縮操作をおこなっていない汚染用 NV 液そのものから抽出した RNA での実測値を比較すると、TRIzol-LS および RNeasy Mini kit で抽出した場合は、QIAamp Viral RNA Mini kit で抽出した場合の 4~6% にしか相当しない。そのことを考慮すれば、ウイルス濃縮段階に限った回収効率は、低レベル汚染の場合でもパントラ法が PEG 沈殿法より大幅に優れていると考えられる。

D. 考察

1. パントラ法の特長

これまで食品表面のウイルス洗滌液を濃縮する方法として利用されてきたのは、今回の回収実験で比較対照と

じた PEG 沈殿法や、超遠心機利用による濃縮などであった。それらの方法と比べ、パントラ法を実践してみて感じる利点は、操作の簡便さ、必要機材の少なさ、所要時間・作業時間の短さ、など数多く挙げられる。何よりも、パンソルピン-抗 NV 抗体-NV 複合体を回収する遠心操作後の沈殿状態は、PEG 沈殿法で得られる沈殿と比較して格段に扱いやすく、ストレスなく処理を進めることが可能な有利さは大きい。

2. 今後の検討方向

今回行った汚染食品からの NV 回収実験において、ウイルス濃縮法以外で回収効率に影響を及ぼすと考えられる以下のような因子が、今後の検討課題となると思われる。

1) 汚染食品洗滌液の組成

汚染食品の表面から効率よくウイルスを洗い落とすことが可能で、かつパンソルピン-抗 NV 抗体-NV 複合体の形成を妨げない洗滌液が望ましい。組成の検討次第で回収率アップが期待できる。

2) RNA 抽出法

現在、液体サンプルからのウイルス RNA 抽出法として広く使われ、食品洗滌液の PEG 沈殿法による濃縮液からの RNA 抽出にも多く使われている QIAamp Viral RNA Mini kit は、操作が簡便なうえ、標準でキャリアー RNA を溶解液に含むことなどから RNA 回収率が高い。パントラ法ではパンソルピン-抗 NV 抗体-NV 複合体 (= 固体) からの RNA 抽出となるため、QIAamp Viral RNA Mini kit そのままの適用は難しく、今回は

TRIZOL-LS および RNeasy Mini kit での抽出とした。しかし、TRIZOL-LS 系へのキャリアー RNA の使用導入などによる RNA 回収率を向上させる改善、あるいはパンソルピン-抗 NV 抗体-NV 複合体からの効果的な NV 洗い出しによる液体サンプル化が実現すれば QIAamp Viral RNA Mini kit の適用、また他のキットや抽出系の検討など、さまざまな可能性が考えられる。

3) 逆転写反応でのプライマー選択

NV の公定法で示されている Random Primer による逆転写を今回用いた。しかしパントラ法で濃縮し抽出した RNA には、黄色ブドウ球菌由来 RNA が混入している可能性があり、NV 由来 RNA についての逆転写効率が低くなることも推定された。

そこで、黄色ブドウ球菌の 16S rRNA をリアルタイム PCR で定量測定する実験系 (Vandecasteele ら, J. Bacteriol. 2001: 183; 7091-7101) で、今回の cDNA をテンプレートとして測定したところ、かなりの量の黄色ブドウ球菌由来 RNA 混入が実際に確認された。特に NV 汚染濃度を低くしていった検討サンプルでは、NV 実測値の減少の度合いにくらべ、黄色ブドウ球菌由来 RNA 実測値はほぼ一定で、黄色ブドウ球菌由来 RNA の占める割合が高くなっている可能性が強いと考えられた。

以上のことをふまえば、逆転写に用いるプライマーを NV 特異的なプライマーに変えることで、逆転写効率の向上が見込めるのではないかと思われる。

E. 結論

食品からの NV 回収をより簡便かつ効果的に行える可能性を備える、新規に開発されたパントラ法を、NV 陽性糞便で汚染させたモデル食品に適用したところ、実用化につながる可能性が確認された。食品の種類によって回収結果がばらついた PEG 沈殿法に対し、パントラ法では比較的安定した回収結果が得られた。NV 汚染濃度が低くなると PEG 沈殿法の成績がまさる傾向が見られたものの、回収効率に影響を及ぼす因子の検討次第でさらなる改善が可能と考えられ、実用化の可能性の高い有望な濃縮法と期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

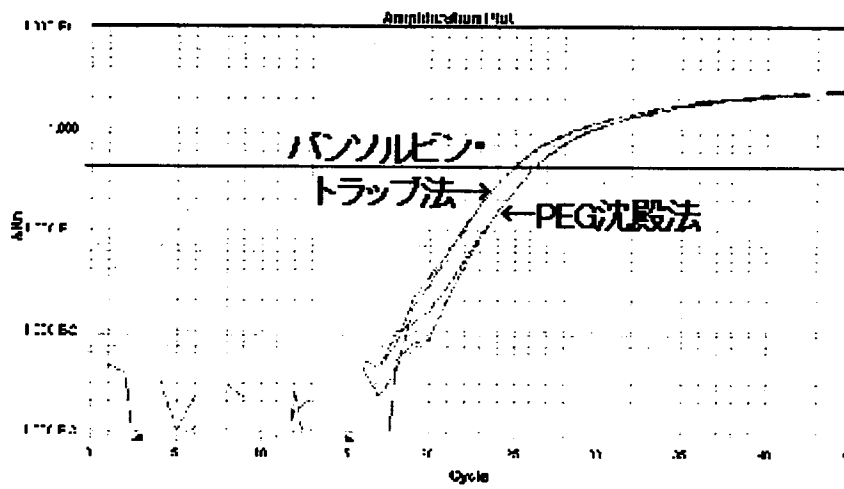


図1. ナポリタンからのNV回収実験(増幅曲線)

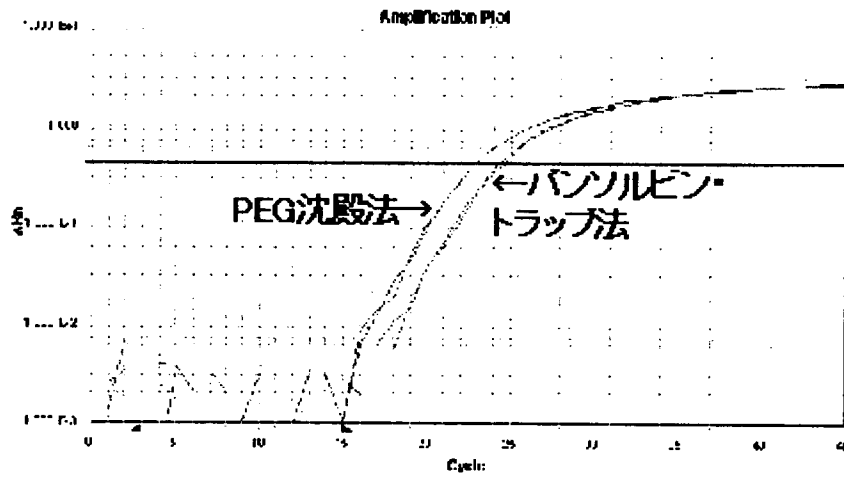


図2. マカロニサラダからのNV回収実験(増幅曲線)

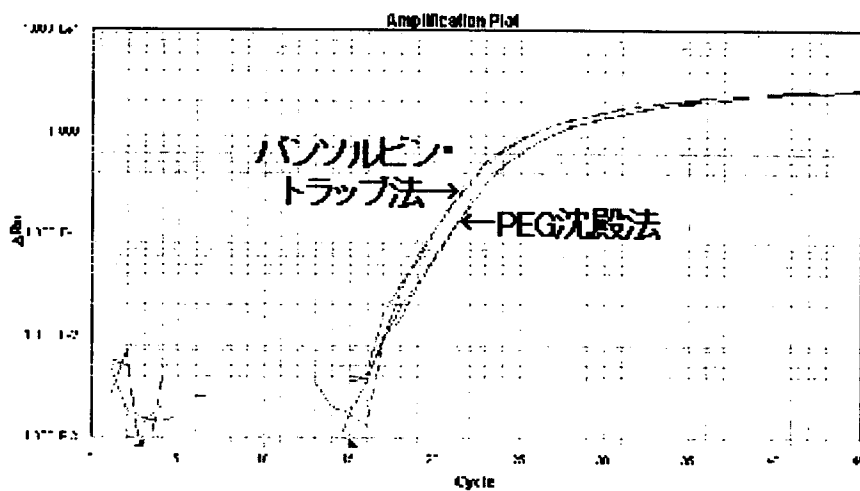


図3. ポテトサラダからのNV回収実験(増幅曲線)

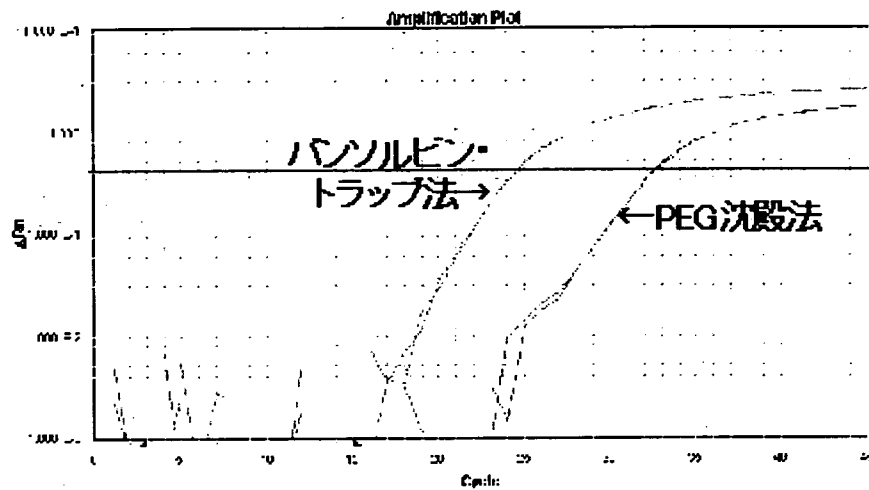


図4. まぐろ刺身からのNV回収実験(増幅曲線)

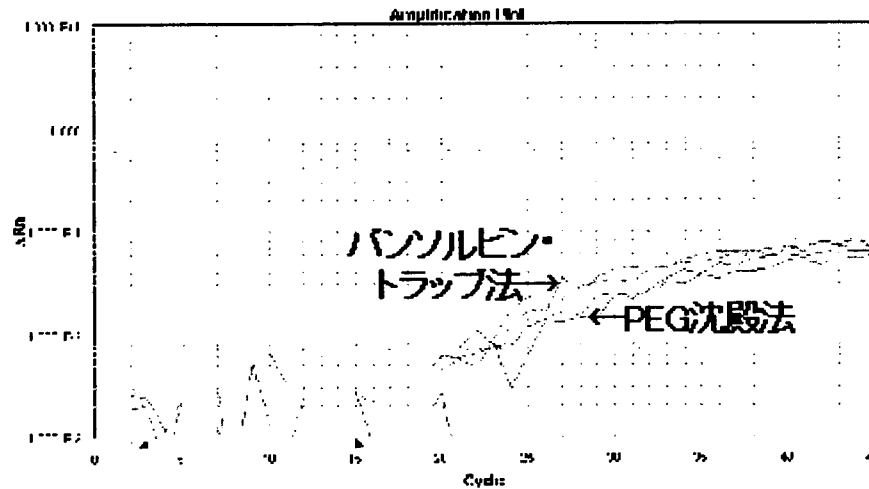


図5. ひじき煮付からのNV回収実験(増幅曲線)

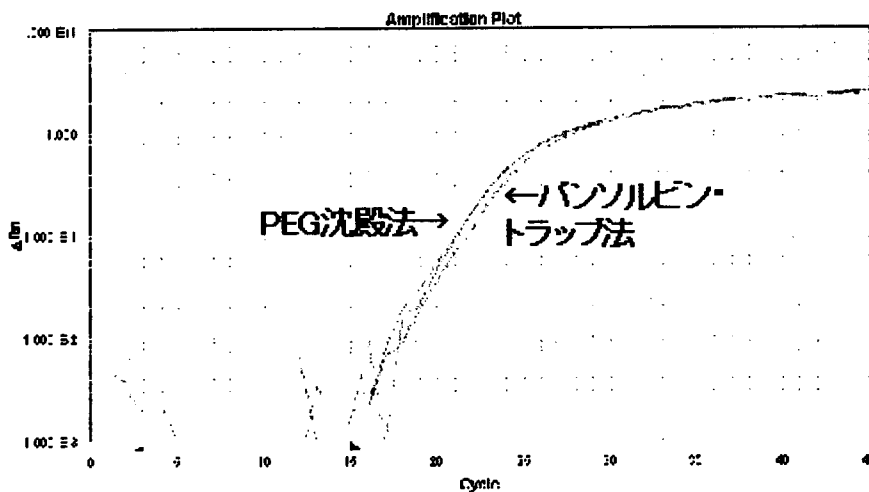


図6. 切り干し大根煮付からのNV回収実験(増幅曲線)

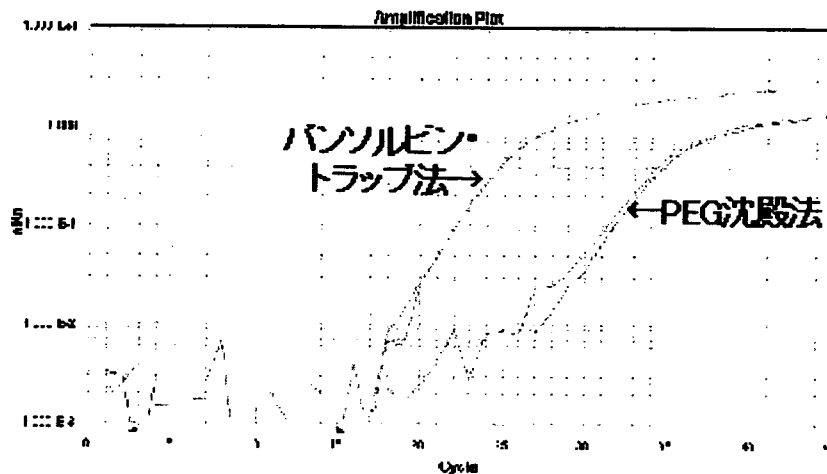


図7. もやし和え物からのNV回収実験(増幅曲線)

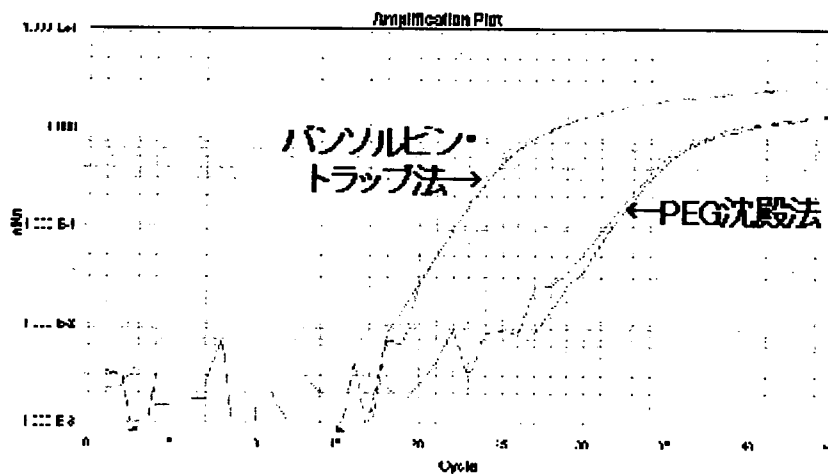


図8. 食品なしの場合のNV回収実験(増幅曲線)

表1. 食品種類別でのNV実測値

NV 実測値* (コピー /μL)	RNA抽出法	TRIZOL-LS +RNeasy	TRIZOL-LS +RNeasy	PEG 沈殿法を 1とした ときの 効率(倍)
	濃縮法	パンソルビン ・トラップ法	PEG 沈殿法	
ナポリタン		4.179E+04	1.634E+04	2.56
マカロニサラダ		5.286E+04	1.591E+05	0.33
ポテトサラダ		1.918E+05	9.027E+04	2.12
まぐろ刺身		4.585E+04	1.721E+02	266.38
ひじき煮付		N.D.**	N.D.**	-
切り干し大根煮付		4.921E+04	7.816E+04	0.63
もやし和え物		3.818E+04	4.608E+01	828.68
食品なし		5.379E+04	1.276E+02	421.44

*抽出RNA1μLあたりのコピー数

**検出できず

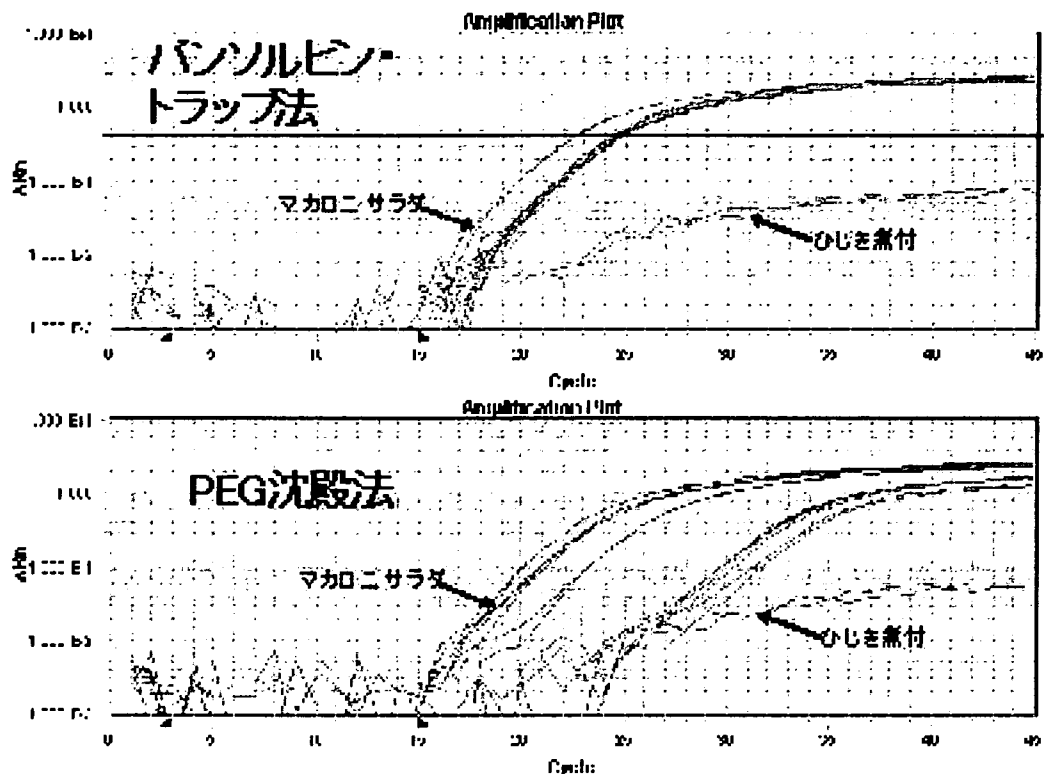


図9. 食品からのNV回収実験(増幅曲線);濃縮法別

表2. 汚染用NV液希釈濃度別でのNV実測値

NV 実測値* (コピー /μL)	RNA抽出法	TRIZOL-LS +RNeasy	Viral RNA	PEG 沈殿法を 1とした ときの 効率(倍)
	濃縮法	パンソルビン ・トラップ法	PEG 沈殿法	
ナポリタン	10倍希釈	2.206E+04	8.832E+03	2.50
	100倍希釈	5.531E+02	4.140E+02	1.34
	1000倍希釈	1.018E+02	4.677E+01	2.18
	10000倍希釈	1.438E+01	4.291E+01	0.34
マカロニサラダ	10倍希釈	5.423E+04	1.435E+05	0.38
	100倍希釈	8.554E+03	2.986E+04	0.29
	1000倍希釈	5.912E+02	4.220E+03	0.14
	10000倍希釈	1.201E+02	4.954E+02	0.24
汚染用NV液	10倍希釈	5.767E+04	8.970E+05	0.06
	100倍希釈	6.093E+03	9.690E+04	0.06
	1000倍希釈	4.703E+02	1.065E+04	0.04
	10000倍希釈	4.724E+01	1.087E+03	0.04

*抽出RNA1μLあたりのコピー数

平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金食品の安全・安心確保推進研究事業
「ウイルス性食中毒の予防に関する研究」
研究協力報告書

堺市内下水におけるノロウイルスの動態

研究協力者 内野清子 (堺市衛生研究所)
分担研究者 田中智之 (堺市衛生研究所)
研究協力者 三好龍也、中村武、松尾光子、吉田永祥 (堺市衛生研究所)
堺市下水道部

研究要旨:

2006 年 4 月から 2008 年 1 月にかけて、堺市内におけるノロウイルス (NV) 集団発生及び散発発生から得られた NV 遺伝子 81 株、同時期に、堺市内の下水 4 定点から毎月 1 回採水した下水 22 検体、下水処理場の流入水 22 および放流水 22 検体の計 66 検体から得られた NV 遺伝子の解析を行った。これらの結果から、当市全体としては少なくとも NV Genogroup I, Genotype 1 (NV GI/1), GI/4, GI/8, GI/10, GI/12, GI/14, NV GII/2, GII/3, GII/4, GII/5, GII/6, GII/13 の 12 種類の NV 浸入・暴露が考えられ、2006/2007 シーズンに引き続き 2007/2008 シーズンにおいても GII/4 が流行の主流であった。

環境中 NV 遺伝子量は 2006 年 6 月を除き、散発・集団の発生状況とほぼ連動して増減した。また、同時期に集団発生から検出された NV 遺伝子と相同性の高いウイルスが環境中からも検出され、環境汚染と NV 感染症には密接な関連性があることが示唆された。流行期以外の 2006 年 6 月に環境水中の NV 遺伝子量の増加がみられ、遺伝子解析から、GII/4 の増加が認められた。流行期の前に、感染症として表面化しない不顕性感染の拡大があり、その結果 06/07 の GII/4 流行に繋がった可能性が考えられた。

A. 研究目的

散発・集団発生の感染性胃腸炎患者の臨床検体と、下水からの環境検体の両面から、ノロウイルス (NV) を行い、NV 流行の全体像をより把握できる試みを継続して行なった。2006/2007 の流行シーズンは当市においても、GII/4 による感染症集団発生や散発発生が多発した。

今回、2006 年 4 月から 2008 年 1 月にかけて、臨床検体と環境中 NV 遺伝子の検出状況から 2006/2007 シーズン

大流行について考察することを目的とした。

B. 研究材料と方法

1. 材料

1) 集団発生事例および散発発生からの臨床検体

2006 年 4 月から 2008 年 1 月にかけて、堺市内で発生した集団発生 31 事例から得られた RT-PCR 法陽性 33 株と、感染症発生動向調査および小児科から得られた散発発生 RT-PCR

陽性 48 株の合計 81 株を用いた。

2) 環境検体

2006 年 4 月から 2008 年 1 月にかけて、堺市内の下水 1 定点 (A; マンホールから採水) と、下水処理場 3 定点 (B ~ D) の計 4 定点から、毎月 1 回、2,000ml 採取した。これら下水 22 検体、下水処理場の流入水 22 および放流水 22 検体の計 66 検体を検査対象とした。

2. 方法

1) 集団発生および散発発生臨床検体
NV 陽性株は、NV 遺伝子 Capsid 領域の 5' 側約 280bp の塩基配列を決定し、系統樹解析により遺伝子型を判定した。

2) 環境検体

採取した 2,000ml の水は粗遠心後、上清 1,000ml を分取し、HCl で pH3.5 に調整、HA フィルター (450 μ l) でウイルスを吸着濾過後、フィルターを細断し、2.0ml の pH10.5 グリシン buffer で溶出を行い、HCl で pH6.5 に調整しサンプルとした。サンプルから QIAamp viral mini RNA キットにて RNA 抽出を行い、DNase I 処理を行った後、random hexamer を用いて Super Script II RT で逆転写し、cDNA 合成を行った。リアルタイム PCR 法による NV 定量では、プライマーは COG1F/COG1R と COG2F/COG2R、プローブはそれぞれ RING1-TPa および RING1-TPb、RING2AL-TP を用い、ABI PRISM 7900 で G I および G II それぞれの NV を測定後、採取水 1ml 当たりのコピー数を算出した。

NV 遺伝子型別検査では、1st PCR は COG1F/G1-SKR、COG2F/G2-SKR を、2ndPCR には G1-SKF/G1-SKR、G2-SKF/G2-SKR を用い、G I および G II それぞれの Capsid 領域を増幅し、十

分な遺伝子産物が得られた PCR 産物を TA クローニングベクターに挿入し、Capsid 領域 5' 側約 280bp の塩基配列を決定した。また、系統樹は近隣結合法によって作製した。

C. 研究結果

1) 2006 年 4 月から 2008 年 1 月の臨床検体からの NV 遺伝子型別検出状況を示す (図 1)。

集団発生状況をみると、31 事例中、28 事例 (90%) が G II/4、次いで G II/13 が 2 事例 (6%)、G II/6 が 1 事例 (3%) であった。2006/2007 シーズン (06/07) の発生数は 25 事例あったが、2007/2008 シーズン (07/08) は 6 事例であった。また、両シーズンとも 10 月から事例数増加がみられ、12 月が最も多かった。散発発生状況では、検出した 48 株中 43 株 (90%) が G II/4、続いて G/1, G/8, G/12, G II/2, 13 がそれぞれ 1 株 (2%) であった。06/07 の検出数は 44 株であったが、07/08 は 4 株であった。集団発生状況と同様に、両シーズンともに 12 月の検出数が最も多かった。

2) 堺市内の下水 1 定点 (A) と、下水処理場 3 定点 (B ~ D) を示す (図 2)。また、採取した下水の NV リアルタイム PCR 測定結果を示す (図 3)。下水中 NV は G I、G II とともに 06/07 は 6 月と 1、2 月 をピークとする 2 峰性を示したが、07/08 は 11、12 月をピークとする 1 峰性であった。下水中 NV 量は 2006 年 6 月を除き、散発・集団発生とほぼ連動して増減し、G I より G II の遺伝子量が多く検出された。最も多く検出されたのは 06/07 で

は、12月C定点の流入水でNV G II 730copy/ml、07/08は12月B定点の流入水で10,931copy/mlと07/08の方が高いコピー数であった。NV GIリアルタイムPCR測定結果をみると、06/07に比べ、07/08は増加傾向であった。また、流入水と塩素処理後水を比べると、塩素処理後の放流水の方が約1/5以下に減少していた。下水定点におけるNV遺伝子型別検出状況を示す(図4)。環境検体ではGI/1, 4, 10, 14, GII/2, 3, 4, 5, 6, 13の10種類が検出された。特にGII/4は2006年6月に、どの定点からも検出されていた。また、06/07に比べ07/08は多様な遺伝子型のNVが検出されていた。4)臨床および環境検体からのGII/4系統樹を示す(図5)。GII/4遺伝子塩基配列を解析すると、同時期に集団発生から検出されたNV遺伝子と同一性の高いウイルスが環境中からも検出され、環境汚染とNV感染症には密接な関連性があることが示唆された。

D. 考察

2006年4月から2008年1月のNV流行状況を環境と臨床の両面から検討した。臨床検体と環境検体のNV遺伝子型別検出状況から、本市全体としては少なくともGI/1, GI/4, GI/8, GI/10, GI/12, GI/14, GII/2, GII/3, GII/4, GII/5, GII/6, GII/13の12種類のNVの暴露が考えられた。多様な検出状況ではあったが、06/07に引き続き、07/08においてもGII/4が流行の主流であることが推測された。

環境中NV遺伝子量は2006年6月を

除き、散発・集団発生状況とほぼ連動して増減していた。臨床面でのGIの関与事例は少なく、環境水中のGIのコピー数も少なかった。NV GIIリアルタイムPCR測定結果では06/07の方が07/08よりもNV量が多いと推定されたが河川の定点地点が異なっているが、予想より低い結果であった。地域差なのか、全体的な変化なのかは不明である。また、2006年6月を除き、11月から2月のNV流行期に連動して、環境水中のNVコピー数の増加があったことや、感染症の主流株であるGII/4が環境水中でも優位であったこと、流行期の臨床検体由来のNV遺伝子と環境水由来のNV遺伝子が相互に高い同一性を持っていたことなどから、感染症と環境水汚染には密接な関係があることが示唆された。

E. 結論

NV流行期以外の2006年6月に環境水中のNV遺伝子量の増加がみられ、遺伝子解析からそれらはGII/4遺伝子の増加と推定された。感染症として表面化しない不顕性感染の存在があり、GII/4浸淫が市内全域で拡大し、その結果06/07のGII/4流行に繋がった可能性が考えられた。

この調査により、市内NV感染の全体像を把握し、特徴的な傾向が出現した際には、関連機関に警報を促すなど、感染防止に役立てたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 田中智之、三好龍也、内野清子、武田直和
院内発生時における感染拡大防止対策—ノロウイルス

- 月刊薬事 49 (11) : 37-42, 2007
- 2) 田中智之、三好龍也、内野清子、
武田直和
調理従事者を介して起こるノロ
ウイルス食中毒 食と健康 10:
6-14, 2007
- 3) 田中智之、加藤大介、鎌田公仁
夫、三好龍也、内野清子、吉田永
祥、田尻 仁、奥田真珠美、中山
佳子、平山吉郎、北元憲利、武田
直和
ノロウイルス迅速抗原検査
検査と技術 36 (3) : 235-239, 2007

2. 学会発表

- 1) 福田伸治、三好龍也、内野清子、
中村 武、吉田永祥、田中智之
28 回衛生微生物技術協議会第研
究 岡山市 2007 年 7 月
- 2) 中村 武、三好龍也、内野清子、

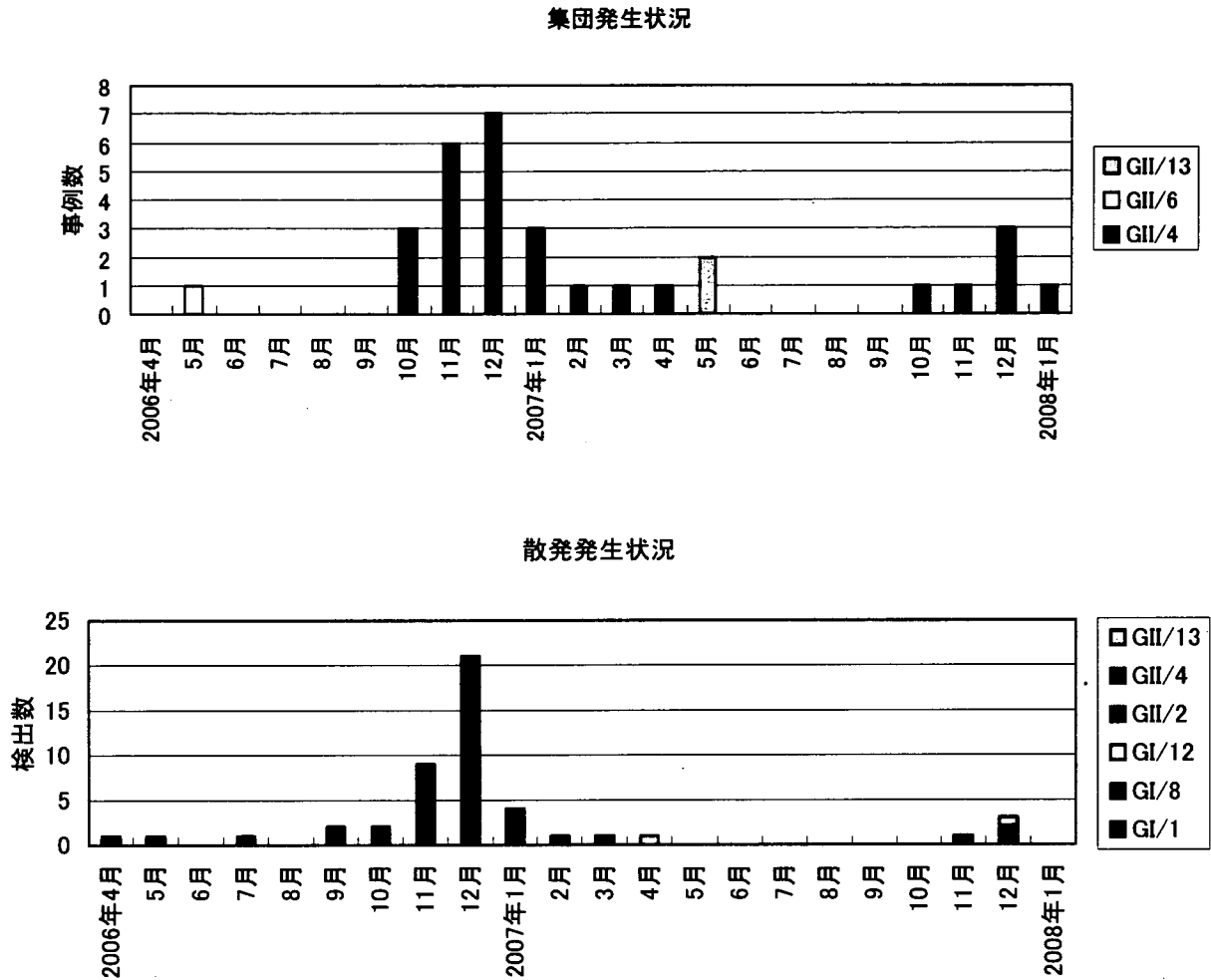
福田伸治、田中智之
市販ノロウイルス検査キットの
評価 第 55 回日本ウイルス学
会学術集会 札幌市 2007 年 10
月

- 3) 北元憲利、三好龍也、内野清子、
Grant S. Hansman、武田直和、田
中智之
サポウイルスに対する単クロー
ン抗体の樹立とその交叉性
第 55 回日本ウイルス学会学術集
会 札幌市 2007 年 10 月

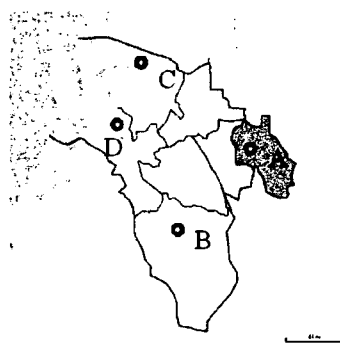
G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

NV 遺伝子型別検出状況 (図 1)

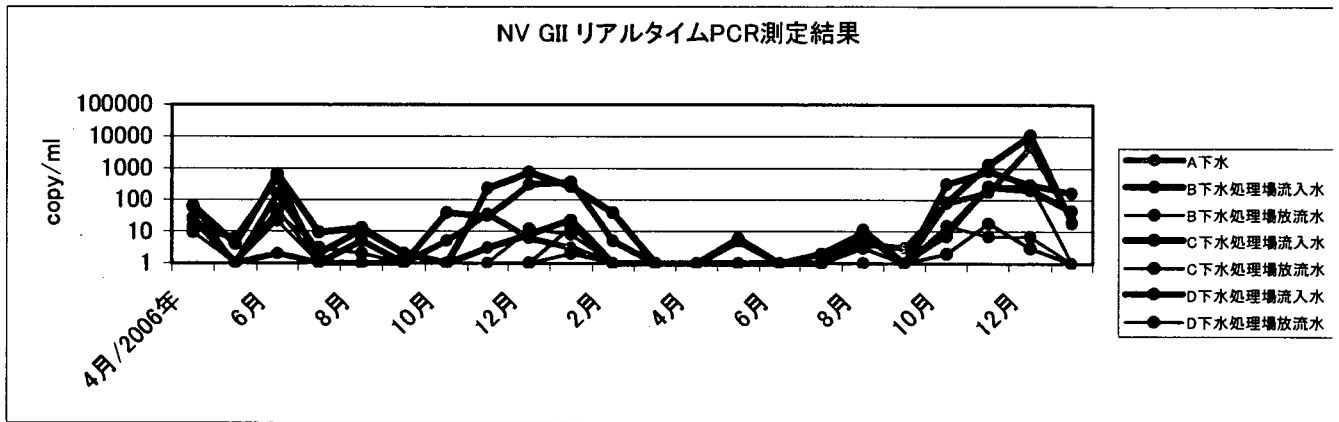
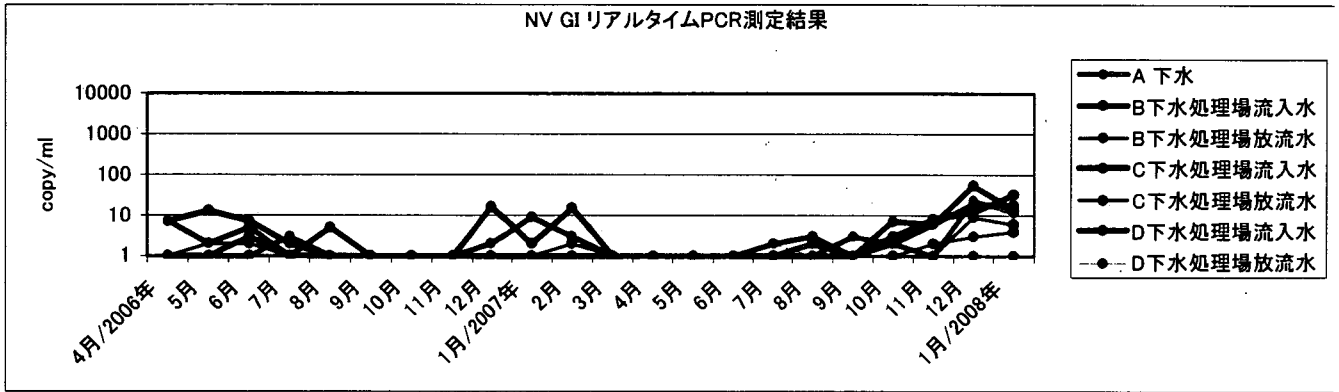


堺市内下水採水定点 (図 2)



A: 下水採取地点 (マンホール)
 B~D: 下水採取定点 (下水処理場)

環境中 NV リアルタイム PCR 測定結果 (図 3)



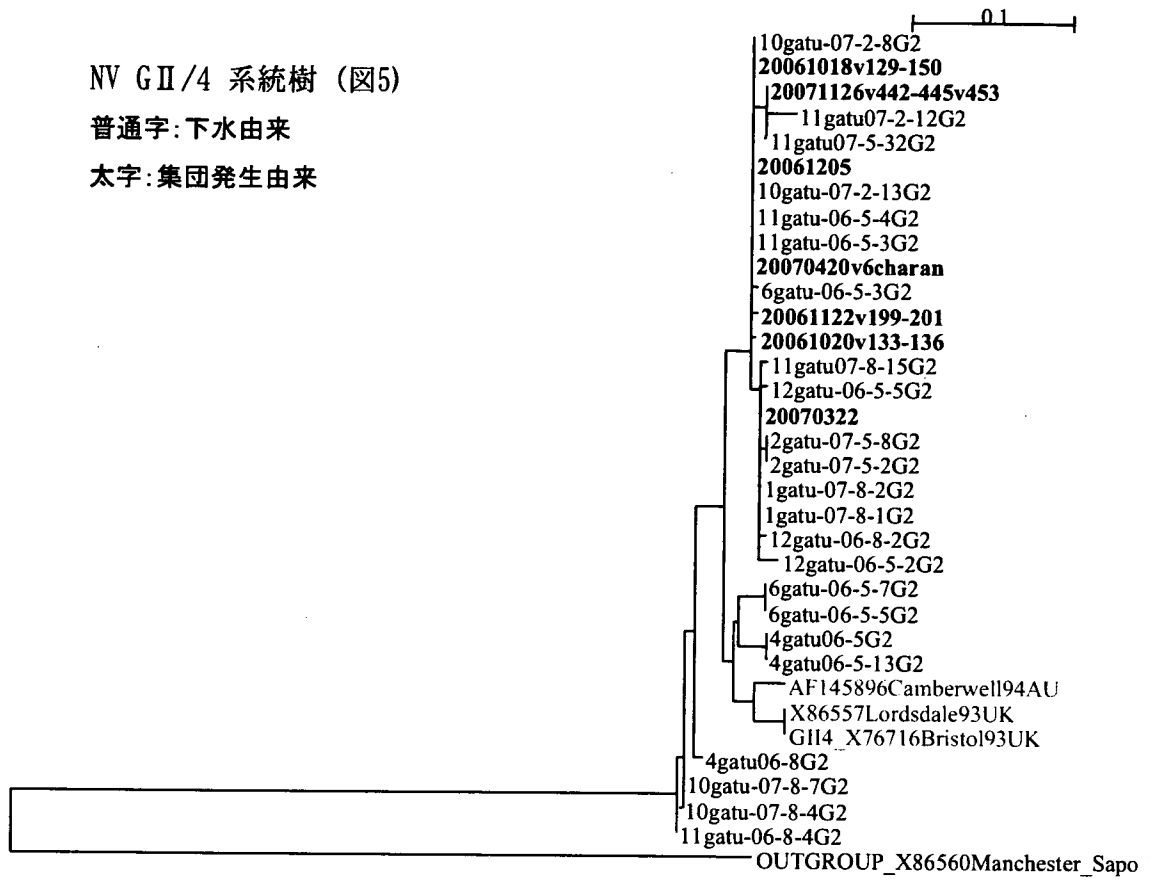
下水定点における NV 遺伝子型別検出状況(図 4)

検出定点	検出時期	GI/10	GI/14	GI/5	GI/6	GI/13
A下水	2006年 4月					
	6月					
	11月					
	12月					
	2007年 1月					
	2月					
	10月					
	11月					
	12月					
	2008年 1月					
B下水処理場流入水	2006年 4月					
	6月					
	11月					
	12月					
	2007年 1月					
	2月					
	10月					
11月						
12月						
2008年 1月						
C下水処理場流入水	2006年 4月					
	6月					
	11月					
	12月					
	2007年 1月					
	2月					
	10月					
11月						
12月						
2008年 1月						
D下水処理場流入水	2006年 4月					
	6月					
	11月					
	12月					
	2007年 1月					
	2月					
	10月					
11月						
12月						
2008年 1月						

NV GII/4 系統樹 (図5)

普通字: 下水由来

太字: 集団発生由来



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」
協力研究報告書

集団発生事例および散発性胃腸炎からのノロウイルス検出状況

研究協力者 飯塚節子 (島根県保健環境科学研究所)
分担研究者 田中智之 (堺市衛生研究所)
研究協力者 小村珠喜、田原研司 (島根県保健環境科学研究所)

研究要旨:

2006 年、2007 年に県内で検出されたノロウイルス (NV) を対象に分子疫学的解析を行った。2006 年 9 月～2007 年 3 月までに検出された NV は集団発生事例 (12 事例)、散発例ともすべて Genogroup II, Genotype 4 (GII/4) であった。2007 年 7 月以降は散発例では GI/3 と GI/4 の混合流行であり、検出数は 2:1 と GI/3 優位であった。一方、同時期の集団発生事例は 3 事例と少なく、GI/3 1 事例、GI/4 2 事例であった。Capsid 領域の系統樹解析の結果、2006 年 9 月～2007 年 12 月に検出された GI/4 は同一クラスターを形成した。

A. 研究目的

2007 年に流行したノロウイルス (NV) による感染性胃腸炎について、当研究所で検査した集団発生事例および散発例について感染症発生動向調査のデータをもとに 2006 年との比較を行い、流行実態を明らかにする。さらに、患者から検出された NV 遺伝子の分子疫学的解析を行い、NV による食中毒・感染症の予防に資するための基礎資料とすることを目的とした。

B. 材料と方法

1. 材料

2006 年 1 月～2007 年 12 月に発生しノロウイルス (NV) が検出された集団

発生事例 20 例の検出株と同時期に NV が検出された散発例 124 例を対象とした。

感染性胃腸炎の流行状況は島根県感染症発生動向調査の定点医療機関からの感染性胃腸炎患者報告数を用いた。

2. 検査方法

NV 遺伝子検出には「ノロウイルスの検出法」(平成 15 年 11 月 5 日厚生労働省食安監発第 1105001 号) に準じ、前処理・核酸抽出・逆転写を行い、集団発生事例の検体はリアルタイム PCR で、散発例の検体は 5' 末端をピオチン化した Kojima ら (J. Virol. Methods., 100, 107-114, 200

2)のプライマーを用いて RT-PCR 法で検出した。リアルタイム PCR で陽性となった検体は散発例と同じプライマーを用いて Capsid 領域を増幅した。得られた PCR 産物を斎藤らの方法で SSCP 解析してグループ分けし、各グループの代表株 (集団発生では各事例 1 株以上) についてダイレクトシーケンシングにより塩基配列を決定し遺伝子型を同定した。遺伝子型別および遺伝子番号は Katayama ら (J. Clin. Microbiol. 2004;42:2988-2995.) の方法に従った。系統樹解析は Capsid 領域 290bp について MEGA3.1 を用いた近隣結合法により行った。

C. 研究結果

1. NV 集団感染事例の発生状況

2006、2007 年に発生した NV による集団発生事例の概要を示す (表 1)。2006 年は 14 事例、2007 年は 6 事例 (うち 1 事例は原因施設は県外) の発生があり、本年は昨年と比べ、1/3 程度の発生数であった。感染経路別では 2006 年は 10 事例が食品媒介、3 事例がヒト-ヒト感染が疑われた。2007 年は 3 事例が食品媒介、2 事例がヒト-ヒト感染が疑われた。さらに食品媒介が疑われた 13 例中 7 事例で無症状の調理従事者からも NV が検出された。

Genogroup 別にみると、2006 年は G II 単独が 12 事例、G I 単独、G I と G II 重複が各 1 事例であった。2007 年は G II 単独が 4 事例、G I 単独が 1 事例であった。G II が検出された事例の genotype は 2006 年はすべて G II/4、

2007 年は G II/3 1 事例、G II/4 4 事例であった。

2. 感染性胃腸炎の流行状況

図 1、2 に 2006、2007 年の患者報告数と下痢症関連ウイルスの検出数を示した。今シーズンは第 30~38 週に NV G II による胃腸炎の小流行が認められた一方、第 49 週をピークとする大きな流行時には NV G II とともにサポウイルス (SV) が検出されており、この時期の流行に 2 つのウイルスが関与していたことが示唆された。昨シーズンと比較すると冬期の流行ピーク時の患者報告数はほぼ同じであるが、NV の検出率は昨シーズンより低い。

3. NV の遺伝子型の推移

散発例から検出された G II の遺伝子型の推移を図 3、4 に示した。2006 年 1~4 月までは G II/2、G II/4、G II/6 が混在していたが、9 月以降 2007 年 3 月までは G II/4 のみが検出された。その後、2007 年 4、5 月に G II/13 が 2 株検出されたが、7 月以降は G II/3 と G II/4 とが検出され、検出数で見ると G II/3 優位であった。

2007 年 4 月~12 月に検出された G II 株について実施した SSCP 解析の結果を表 2 に示す。なお、集団発生事例は事例内のパターンがすべて一致したので 1 種類の株とした。G II/3 は 6 パターン、G II/4 は 7 パターン、G II/13 は 1 パターンに分かれた。集団発生事例由来株の G II/3 については散発例由来株の 1 つ G II/3-e と同一のパターンであったが、G II/4 では散発例由来株とは異なるパターンの株も認められ

た (GII/4-f、-g)。

系統樹解析の結果を図5、6に示す。GII/4は2006年9月以降の株は同一のクラスターに属し、2006年4月に採取された散発例由来株 (322-06) のみ別のクラスターを形成した。GII/3はArg320/95/AR類似株であった。

D. 考察

2006年は全国的にNV GI/4による集団感染事例が多発した。島根県においても全国と同様であった。しかし、2007年は発生動向調査事業の患者報告数は昨年並みであったにもかかわらず、集団感染事例は昨年の1/3程度であった。昨年の流行株となったGII/4については感染効率、増殖性の変異の可能性が示唆されていることから本研究ではGII/4の動向を含め、県内で検出されたNVの遺伝子型、さらに塩基配列の解析を行った。

その結果、2006年は集団感染事例と同じく小児の感染性胃腸炎もGII/4によるものであった。一方、2007年の集団感染事例はGII/4が検出された事例が2/3を占めたが、夏以降の感染性胃腸炎の流行はGII/4とGII/3の混合流行であり、GII/3優位であることが明らかになった。そして、Capsid領域の系統樹解析の結果から2007年のGII/4は2006年後半の株と同一のクラスターに属する株であることも明らかとなった。これらのことから2006年に流行したGII/4株は2007年において小児の胃腸炎への関与は少なかったものの集団感染事例では主原因と

なっていたことが示唆された。従って、今後GII/4ウイルスの性質について詳細な解析が必要と思われる。

なお、2006年4月に検出されたGII/4株 (図5、S322-06) は別のクラスターに属していたことから、本県では少なくとも4月までは別系統のGII/4が流行していたものと考えられる。

E. 結論

1. 2007年の集団発生事例から検出されたノロウイルスはGII/4、GII/3、GI/14、散発例から検出されたウイルスはGII/3、GII/4、GII/13、GI/14であった。
2. 2007年に検出されたGII/4はCapsid領域の系統樹解析の結果、2006年9月以降の株と同一クラスターに属した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

- 1) 論文発表
なし
- 2) 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願、登録状況

なし