

れているが、大量の調理従事者の PCR 法での測定には、時間と経費の節約が期待できない。また、高感度であるがゆえに生じる就業期間などの様々な問題点も浮き彫りにされている。

そこで、迅速で簡便なノロウイルス検出法であるイムノクロマト法や短時間に且つ多量検体が測定可能な ELISA 法を整備しておくことは、今後のノロウイルス測定体制にきわめて重要である。加えて、この測定体制の構築はノロウイルス食中毒予防に大きく貢献できるものと考えられる。

今回、過去に構築したイムノクロマト法や ELISA 法の感度を高めかつ RT-PCR 法との一致率を高めるために、ノロウイルス抗原測定法のアップグレードを行った。

## B. 研究方法

ELISA 法の大きな課題は、感度を高めることであった。その大きな原因は、測定検体の gray zone 域の反応、つまり判定不能な非特異反応の率が高く、結果として感度を落としていることが判明した。そこで新たな捕捉抗体の追加と、RT-PCR 法陰性検体、陽性検体を用いた反応値の厳密な統計処理にて cut off 値を決定し、gray zone の反応を著しく明瞭化することが出来た。結果として、前回の ELISA 法に比べ、特異性の向上、感度、RT-PCR 方途の一致率が向上した。

一方、イムノクロマト法は、ELISA 法と同じ抗体を抗原捕捉系・検出系に用いているが、迅速性を追求するために、材

料の前処理である 10%乳剤の作製を簡略化し、直接に綿棒に付着させた検体を反応と混和させようとした。また、検体を直接滴下し、安定に反応させるためにキットに含まれる反応ストリップを保持カセット内に固定した。

## C. 研究結果

これまでの ELISA 法を用いた測定結果は、RT-PCR 法をゴールド・スタンダード法とした場合、一致率は 84.3%、感度 75.4%、特異性 97.6%であった(図 1)。この原因を究明するために同じ材料を用いて、改良した ELISA 法と比較した(図 2)。旧 ELISA 法で陰性の 6 例は改良 ELISA 法で陽性となり、且つ RT-PCR 法でも陽性であった。一方、旧 ELISA 法で陽性は、改良 ELISA 法、RT-PCR 法共に陰性であった。そこで、改良 ELISA 法と RT-PCR 法を比較すると、一致率 91.2%、感度 85.2%、特異性 100.0%となり、ELISA 法のアップグレードが出来た。

一方、イムノクロマト法では、RT-PCR 法との比較では、一致率 89.2%、感度 81.0%、特異性 100%であった。ELISA 法に比べると、測定感度は落ちるものの迅速性、簡便性のメリットは比較にならないものと考えられた。

## D. 考察

ノロウイルスによる食中毒を予防するには、この班の課題である食品中からノロウイルスを検出し喫食前に

予防対策を講じる方法と、食材を調理する段階での食品へのノロウイルス汚染を予防する方法が考えられる。

今回のノロウイルス抗原検出系の構築は、後者の立場でノロウイルスによる食中毒予防対策に寄与するものとする。ノロウイルスの増殖サイトはいまだに不明であるが、人の小腸で増殖している報告がなされている。また、感染小動物での増殖系が見つかっていない現在、ヒトノロウイルスは人の腸管でのみ増殖しているとする見方が妥当と考える。この観点から、ノロウイルス保有調理従業者による食材汚染は、食材の供給状況によっては広域かつ大量の食中毒発生が想定される。

昨年、厚生労働省から通達された「大量調理施設衛生管理マニュアル」は、これらの点を勘案しても極めて的を得た通達と考える。しかし、調理人のノロウイルス検査の重要性は十分理解できるが、検査陽性者の就業制限などの詳細についての言及は見られない。RT-PCR法の使用は、高感度であるがゆえに長期に亘るウイルス遺伝子の検出が十分推察される。その場合、就業開始の根拠は明らかでなく、いたずらに調理従事者に不安を与える要因を含んでいる。

イムノクロマト法やELISA法によるノロウイルス遺伝子の検出限界は $10^5 \sim 10^6$ コピー/糞便グラムである。これまでの成人のノロウイルス排出期間の研究から、 $10^6$ コピーの遺伝子が排出されている時期は発症後約10日である。この時期には便も固形となり、臨床症状は殆

ど消失している。つまり、この時期では調理従事者が用便後、手洗い等の消毒を十分に行えば、食材への汚染頻度は極めて少ないことが考えられる。

したがって、迅速性に欠け、しかも高価な機器整備の必要なRT-PCR法の代替として、今回のELISA法やイムノクロマト法は、大量の検査に十分対応できるノロウイルス抗原検出法と考える。

## E. 結論

ノロウイルス抗原検出ELISA法およびイムノクロマト法を改良し、感度、特異性の向上を図った。その結果RT-PCR法との一致率、検出感度、検出特異性はELISA法、イムノクロマト法でそれぞれ、91.2%、85.2%、100.0% および 89.2%、81.0%、100.0%であった。これらの方法を用いて調理従事者のノロウイルス保有状況を把握し、就業体制を改善することにより食材汚染、さらにはノロウイルス食中毒予防に大きな貢献が出来るものとする。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1) 誌上発表

(1) Kazushi Motomura, Tomoichiro Oka, Masaru Yokoyama, Hiromi Nakamura, Hiromi Mori Hiroataka Ode, Grant S.Hansman, Kazuhiro Katayama, Tadahito Kanda, Tomoyuki Tanaka, Naokazu Takeda,

Hironori Sato and the Norovirus Surveillance Group of Japan include Shima Yoshizumi, Toshiyuki Mikami, Hiroyuki Saito, You Ueki, Takenori Takizawa, Kiyoko Uchino, Mamoru Noda, Reiko Kondo, Yumiko Matsuoka, Sadayuki Funatsumaru and Shinichi Kobayashi

Identification of monomorphic and divergent haplotypes in the 20006-2007 norovirus GII/4 epidemic population by genomewide tracing of evolution history. *J. Virol.* 200 8: 82(222), 11247-11262.

(2) Naotaka Ishiguro, Yasuo Inoshima, Kazuo Suzuki, Tatsuya Miyoshi and Tomoyuki Tanaka  
Construction of three-year genetic profile of Japanese wild boars in Wakayama prefecture, to estimate gene flow from crossedbred Inobuta into boar populations. *Mammal Study* 33: 43-49 (2008)

(3) Tajiri H, Kiyohara Y, Tanaka T, Etani Y, Mushiake S  
Abnormal computed tomography findings among children with viral gastroenteritis and symptoms mimicking acute appendicitis. *Pediatric Emergency Care.* 24(9):601-4. (2008)

(4) 田中智之 ノロウイルス胃腸炎の診断と予防指針 総合臨床 2880; 57(7), 2002-2003

(5) 田中 智之 各種迅速診断法 消化管の感染症 2) ウイルス性胃腸炎 *Medical Technology* 36(13); 1393-1399, (2008)

## 2) 学会発表

(1) Tomoyuki TANAKA<sup>1)</sup>, Daisuke KATO<sup>2)</sup>, Kunio KAMATA<sup>2)</sup>, Tatsuya MIYOSHI<sup>1)</sup>, Kiyoko UCHINO<sup>1)</sup>, Hisaaki YOSHIDA<sup>1)</sup>, Hitoshi TAJIRI<sup>3)</sup>, Masumi OKUDA<sup>4)</sup>, Yoshiko NAKAYAMA<sup>5)</sup>, Yoshiro HIRAYAMA<sup>2)</sup>, Noritoshi KITAMOTO<sup>6)</sup>, Grant S. Hansman<sup>7)</sup> and Naokazu TAKEDA<sup>7)</sup>

A First Authorized Immunochromatography Kit for Rapid Norovirus Diagnosis

The 7<sup>th</sup> China Japan International Conference of Virology 2008, Tokyo

(2) 三好龍也、武田直和、田中智之  
GII/4 型ノロウイルス Particle の発現と血液型抗原との結合

第 56 回日本ウイルス学会学術集会 2008 年 10 月 岡山市

(3) 田村 務、西川 眞、野田 衛、武田直和、田中智之、鈴木 宏  
急性胃腸炎患者から嘔吐後に採取された口腔うがい液中のノロウイルスの定量 第 56 回日本ウイルス学会学術集会 2008 年 10 月 岡山市

(4) 高橋幸三、三好龍也、内野清子、田中智之  
自動核酸抽出機を用いたノロウイルス遺伝子検出の試み

第 56 回日本ウイルス学会学術集会 2008 年 10 月 岡山市

- (5) 加藤大介、三好龍也、内野清子、  
鎌田公仁夫、高橋幸三、武田直和、  
田中智之  
改良 Immunochromatography 法によ  
るノロウイルス抗原検出  
第 56 回日本ウイルス学会学術集  
会 2008 年 10 月 岡山市
- (6) 東方美保、斉藤博之、田中智之、  
武田直和  
食品検体のノロウイルス検査に向け  
たパンソルビン・トラップ法の実用  
性の検討  
第 56 回日本ウイルス学会学術集会  
2008 年 10 月 岡山市
- (7) 斉藤博之、東方美保、田中智之、  
武田直和  
食品からのノロウイルス回収を目的  
としたパンソルビン・トラップ法の開  
発  
第 56 回日本ウイルス学会学術集会  
2008 年 10 月 岡山市
- (8) 本村和嗣、横山 勝、岡智一郎、  
中村浩美、守 宏美、GRANT  
Hansman、片山和彦、田中智之、  
真崎宏則、星野和彦、蒔本 恭、秋  
山美穂、木村博一、神田忠仁、武田  
直和、佐藤裕徳  
ノロウイルスの免疫淘汰と周期的流  
行の分子機序  
第 56 回日本ウイルス学会学術集会  
2008 年 10 月 岡山市
- (9) 田尻 仁、恵谷 ゆり、田中智之  
胃腸炎入院例を対象としたイムノク  
ロマト法によるノロウイルス検出キ  
ットに関する検討  
第 40 回日本小児感染症学会総会・学  
術集会 2008 年 11 月 名古屋市
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
出願中

図 1. ELISA法(旧)とRT-PCR法との比較

		RT-PCR法		
		+	-	
ELISA(旧)法	+	46	1	47
	-	15	40	55
		61	41	102

一致率: 84.30%  
 感 度: 75.40%  
 特異性: 97.60%

図 2. 改良ELISA法とELISA法(旧)との比較

		改良ELISA		
		+	-	
ELISA法(旧)	+	46	1*	52
	-	6**	49	50
		47	55	102

1\*: RT-PCR法陰性  
 6\*\*: 全てRT-PCR法陽性

一致率: 93.10%  
 感 度: 97.90%  
 特異性: 97.60%

図 3. 改良ELISA法とRT-PCR法との比較

		RT-PCR法		
		+	-	
改良ELISA法	+	52	0	52
	-	9	41	50
		61	41	102

一致率: 91.20%  
 感 度: 85.20%  
 特異性: 100.00%

図 4. イムノクロマト法とRT-PCR法との比較

		RT-PCR法		
		+	-	
イムノクロマト法	+	47	0	47
	-	11	44	55
		58	44	102

一致率: 89.20%  
 感 度: 81.00%  
 特異性: 100.00%

平成 20 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 研究分担報告書

## 平成 19 年度の愛知県におけるノロウイルスとサポウイルスの検出状況および ノロウイルスの血清疫学調査

研究分担者 小林慎一 (愛知県衛生研究所 生物学部)  
研究協力者 山下照夫、皆川洋子 (愛知県衛生研究所 生物学部)

### 研究要旨

平成 19 年度の愛知県におけるノロウイルス(NoV)とサポウイルス(SaV)の流行状況を把握するために、感染性胃腸炎の散発事例および非細菌性胃腸炎の集団発生事例からの NoV と SaV の検出を試みた。その結果、NoV については GI. 3、GI. 4、GII. 2、GII. 3、GII. 4、GII. 16 が検出されたが、GII. 4 の検出頻度が最も高く、昨シーズンの流行が継続していたものと推察された。また、SaV については、GI の検出頻度が最も高く、次いで GIV、GII の順であったが、GIV が例年と比べ高頻度に検出された。さらに、愛知県民の NoV に対する抗体保有状況を把握する目的で、GI の 2 株と GII の 5 株、計 7 株のウイルス様粒子(VLPs)を抗原とした酵素抗体法(ELISA)で愛知県民の NoV 抗体保有率を調査した。その結果、県民全体では GII. 4(Narita104)に対する保有率が最も高く、近年の GII. 4 NoV の流行の反映と考えられた。抗体保有率と流行株との関連性を継続調査することにより、今後の流行株の予測、また感染症や食中毒の防疫対策のための基礎資料となることが期待された。

### A. 研究目的

カリシウイルス科に属するノロウイルス(NoV)とサポウイルス(SaV)は、感染性胃腸炎の主要な病原ウイルスである。特に、18 年度の冬季には、NoV の食中毒事件や病院、学校、高齢者施設等でヒト-ヒト感染による NoV 集団感染事例が全国的に多発し、大きな社会問題となった。また、近年は、SaV

による食中毒事件も報告され、ウイルス性食中毒の病因物資の一つとして注目されている。そこで、平成 19 年度の愛知県における NoV と SaV の流行状況を把握するために、感染性胃腸炎の散発事例および非細菌性胃腸炎の集団発生事例からの NoV と SaV の検出を試みた。また、愛知県民の NoV に対する抗体保有状況を把握する目的で、

遺伝子グループ I (GI) の Seto 株 (遺伝子型 : G1) と Chiba 株 (G4) 及び GII の Sinsiro 株 (G3)、Narita104 株 (G4)、Hokushin 株 (G10)、Chitta 株 (G12) と Kamo 株 (G15)、計 7 株のウイルス様粒子 (VLPs) を抗原とした酵素抗体法 (ELISA) を用いて NoV に対する抗体保有率を調査した。

## B. 研究方法

### 1. 研究材料

① 散発事例の検体として、平成 19 年度に感染症発生動向調査協力医療機関で採取された感染性胃腸炎患者糞便 425 検体と嘔吐物 53 検体を使用した。

② 集団発生事例の検体として、当所に搬入された胃腸炎集団発生 18 事例の患者 125 名の糞便検体を使用した。

③ 平成 19 年の 7 月～9 月に採血された愛知県民 200 名 (1～62 歳) の血清で、NoV 抗体測定について本人 (本人が未成年者の場合は親) の同意が得られた血清を使用した。

### 2. 検査方法

#### ① NoV と SaV の RT-PCR 法

臨床検体から RNA 抽出キット (Roche 社製) で RNA を抽出後、RT-PCR 法で NoV と SaV の検出検査を実施した。

NoV 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 RT-PCR を行なった。GI と GII の検出用プライマーとして、それぞれ、GIFa (5' -CGYTGATGCGBTTCATGA-3') /GIRv (5' -CCMACCCADCCATTRTACATYT G-3') と GIIFb (5' -TGGGAGGGC

GATCGCAATCT-3') /GIIRv (5' -GCATAM CCRTRTACATTCT-3') 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。

#### ② NoV 抗体測定法

遺伝子グループ I (GI) の Seto 株 (遺伝子 : G1) と Chiba 株 (G4) 及び GII の Sinsiro 株 (G3)、Narita104 株 (G4)、Hokushin 株 (G10)、Chitta 株 (G12) と Kamo 株 (G15)、計 7 株のウイルス様粒子 (VLPs) を抗原として ELISA プレートに固相化後、サンドイッチ型 ELISA 法で抗 NoV 抗体を測定し、吸光度 0.15 以上を示した被検血清を陽性と判定した。

## C. 研究結果

### 1. 感染性胃腸炎患者からの NoV と SaV の検出状況

#### ① RT-PCR による検査成績

愛知県では、平成 19 年 12 月 20 日付けで「感染性胃腸炎警報」が発令され、18 年度の大流行に続いての流行となった。感染症発生動向調査協力医療機関から搬入された感染性胃腸炎患者の臨床検体を検査した結果、糞便 90 検体 (90/425, 21.2%) と嘔吐物 8 検体 (8/53, 15.1%) から NoV が検出された。その内訳は、糞便検体で GI 陽性が 4

検体(4.4%)と GII 陽性が 86 検体(95.6%)、嘔吐物では GI 陽性が 4 検体(50%)と GII 陽性が 4 検体(50%)であった。また、SaV は糞便 22 検体(22/425, 5.2%)から検出された。

#### ②遺伝子解析

PCR 陽性産物について遺伝子解析を行い、その結果を NoV と SaV の月別・遺伝子型別の検出状況として表 1 に示した。GI NoV 陽性の 8 検体は全て GI.4 に分類され、6 検体(75.0%)が 20 年 3 月のシーズン後半に検出された。

また、GII NoV 陽性の 90 検体は GII.2 : 1 検体、GII.3 : 1、GII.4 : 86、GII.16 : 2 の 4 遺伝子型に分類されたが、GII.4 が 95.6%と大勢を占めていた。GII NoV は感染性胃腸炎の流行時期(11 月～12 月)に一致して高頻度(69/90、76.7%)に検出された。

一方、SaV 陽性 22 検体は、GI : 14 検体(63.6%)、GII : 1(4.5%)、GIV : 7(31.8%)と、3 遺伝子型に分類された。SaV は 4～7 月に 17 検体(GI 型:9、GII 型:1、GIV 型:7)と 11～12 月に 5 検体(全て GI 型)が検出され、流行時期に NoV との違いが認められた。

### 2. 胃腸炎集団発生事例からの NoV と SaV の検出状況

#### ①RT-PCR による検査成績

胃腸炎集団発生 18 事例の患者糞便 125 検体のうち、GI 陽性が 2 事例の 10 検体(10/125, 8.0%)、GII 陽性が 16 事例の 76 検体(76/125, 60.8%)であった。集団発生事例からの SaV 検出例はなかった。

#### ②遺伝子解析

表 2 に胃腸炎集団発生事例から検出された NoV の月別・遺伝子型別の事例数を示した。GI 陽性 2 事例の遺伝子型は、20 年 3 月の GI.3 と 20 年 2 月の GI.4 の各 1 事例であった。GII 陽性 16 事例は、GII.3 の 1 事例と GII.4 の 15 事例であり、そのほとんどが GII.4 に起因する事例であった。

### 3. NoV に対する抗体保有状況調査

図 1 に、愛知県民 200 名の 10 年齢階層別(各 20 名)の NoV に対する抗体保有率を示した。NoV 7 株に対する県民全体の抗体保有率は、Seto 株(G1):24.0%、Chiba 株(G4):32.0%、GII の Sinsiro 株(G3):37.5%、Narita104 株(G4):69.5%、Hokushin 株(G10):32.0%、Chitta 株(G12):42.0%、Kamo 株(G15):47.0%であった。各年齢階層で GII.4 (Narita104)に対する保有率が最も高い傾向が認められ、近年の GII.4 株の流行を反映する結果と考えられた。

### D. 考察および結論

愛知県では、平成 19 年の第 50 週で感染症発生動向調査定点あたりの感染性胃腸炎患者報告数が警報開始基準値を超えたことから 12 月 20 日付けで「感染性胃腸炎警報」発令され、18 年度の大流行に続いての流行となった。平成 18 年度は GII NoV の大流行であったが、平成 19 年度は、散发事例と集団発生事例から GI NoV が高頻度に検出されたことが特徴的であった。平成 20 年 3 月に散发事例患者から GI.4 NoV が検出されるとともに、



GI に起因する集団感染事例が 2 月 (GI. 4) と 3 月 (GI. 3) に発生した。

一方、GII. 4 NoV が感染性胃腸炎がピークとなる 11 月から 12 月にかけて高率に検出され、2 年連続の流行となった。GII. 4 については 2002 年 (平成 14 年) 以降、2002 年、04 年、06 年に、ウイルス遺伝子の一部が変化した GII. 4 変異型の出現が報告されており、今後とも GII. 4 の遺伝子進化については注目が必要である。

SaV には 5 つの遺伝子群 (Genogroup I~V) が知られているが、ヒトから検出されるのは I, II, IV, V の 4 遺伝子群である。わが国においても、ヒトから 4 遺伝子群が検出されているが、GI の検出頻度が最も多く、次いで GII であり、IV と V の検出は低いとされてきた。しかし、今回の調査では、GI の 14 検体に次いで、GIV が 7 検体と GIV が高頻度に検出された。全国的にも、SaV に起因した 19 年 5 月の京都市での修学旅行生の集団食中毒事例や 11 月の和歌山市内の身体障害者援護施設での集団感染事例、また、熊本県での 9 月~12 月にかけての地域流行が報告されている。これらの事例からは SaV GIV が検出され、SaV IV の流行は全国的であったと推察された。今後とも、SaV についても NoV と同様、食中毒および感染症の両面から検討する必要がある。

愛知県民の NoV 抗体保有状況調査において、県民全体の GI の 2 株と GII の 5 株に対する保有率を比べると、GII の Narita104 株 (G4) に対する保有率が

最も高率であった。NoV は継代細胞で増殖できないため、ELISA による抗体価と中和抗体価との相関性検討は困難である。血清中の抗 NoV 抗体の感染防御における役割は明確でないが、GII. 4 株に対しての抗体保有率が高いことは、近年の GII. 4 株の流行を反映する結果と考えられた。今後は、抗 NoV 抗体保有率の推移とともに散发事例や集団発生から検出される NoV の遺伝子型を継続調査することにより、感染症や食中毒の防疫対策に資する基礎資料の提供とともに次シーズン NoV 流行型や流行規模の予測等の可能性についても検討したい。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

Motomura K, Oka T, Yokoyama M, Nakamura H, Mori H, Ode H, Hansman GS, Katayama K, Kanda T, Tanaka T, Takeda N, Sato H, and the Norovirus Surveillance Group of Japan. Identification of monomorphic and divergent haplotypes in the 2006-2007 norovirus GII/4 epidemic population by genomewide tracing of evolutionary history. *J Virol.* 82:11247-62, 2008

### 2. 学会発表

小林慎一、伊藤 雅、山下照夫、皆川洋子：平成 19 年度の愛知県におけるノロウイルスとサポウイルスの検出状況。第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山市、2008 年。

表1 散発性胃腸炎患者からのノロウイルスとサポウイルスの  
月別・遺伝子型別検出状況（平成19年度）

	NV GI		NV GII			SaV		
	GI.4	GII.2	GII.3	GII.4	GII.16	GI	GII	GIV
4月						1		
5月						2		3
6月				1			1	3
7月						6		1
8月								
9月				1				
10月				1				
11月	1	1		19		4		
12月	1			49		1		
1月			1	6				
2月				5	2			
3月	6			4				
計	8	1	1	86	2	14	1	7

表2 胃腸炎集団発生事例から検出された  
ノロウイルスの月別・遺伝子型別の事例数

	NV GI		NV GII	
	GI.3	GI.4	GII.3	GII.4
4月				1
5月				
6月				
7月				
8月				
9月				
10月				
11月				2
12月				7
1月				2
2月		1		2
3月	1		1	1
計	1	1	1	15

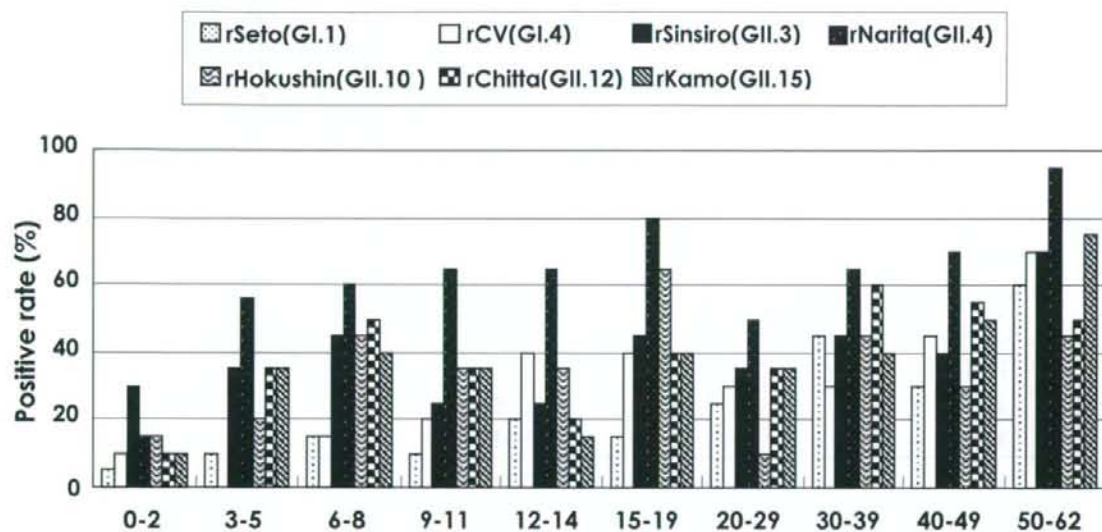


図1 ノロウイルスに対する愛知県民の抗体保有状況（平成19年度）

## パンソルビン・トラップ法の実用化に向けた改良(検討 1)

分担研究者: 斎藤博之 (秋田県健康環境センター・保健衛生部)

**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手法としてパンソルビン・トラップ法(パントラ法)の開発を昨年度に着手した。今年度は実用化に向けた問題点を洗い出し、それを解決するためのプロトコル改良を行った。その結果、全国的に汎用されているカラム方式の RNA 抽出キットに適用させることができ操作性が向上した。また、検出効率の再現性に影響を及ぼす主因となっている炭水化物の混入を抑える方法を取り入れることができた。さらに、低濃度汚染の検体であっても検出効率を維持することができるようになった。実際の検査局面を視野に入れて Nested PCR と組み合わせたと、食品 1g 当たり焼ソバで 13 コピー、ポテトサラダで 44 コピーまで検出が可能であった。本法を用いることで一般的な食品から NV を検出することが可能となれば、調理従事者の衛生管理意識の一層の向上を促すことに繋がり、食中毒の抑止効果が期待できるものと考えられた。

### A. 研究目的

ウイルス性食中毒の大部分を占めるのがノロウイルス (NV)であり、対策として二枚貝の汚染実態調査や、調理従事者への衛生教育等が進められてきている。しかしながら、原因として疑われる食品からのウイルス検出は、その作業の困難さからこれまでほとんど検討されてこなかったため、具体的な汚染ルートの解明に決め手を欠いているのが実情である。昨年度の本研究事業において、固形、液状、練り物、油物などの一般的な食品から NV を検出する手法としてパンソルビン・トラップ法(パントラ法)を開発し、この問題を解決するための方向性を見出すことができた。一方で、開発初期であるがゆえの課題も存在したため、今年度はより実用性を向上させるためのプロトコル改良を行った。

昨年度の時点で残された課題は次の 4 つである。

- ①全国的に汎用されているカラムによる精製方式に合わせること。
- ②炭水化物の混入を抑えること。
- ③低濃度汚染検体での検出効率を向上させること。
- ④GⅡ/4 以外の血清型へ対応させること。

本稿では①の概要及び②について改良策を報告することとし、①の詳細と③については別稿(研究協力報告書:東方・福井)を参照されたい。④については引き続き平成 21 年度の研究課題とした。

### B. 研究方法

#### 1. 研究材料

汚染実験に用いる食品として、市販されているポテトサラダと焼ソバを用いた。また、検

出対象となる NV として、2006 年 12 月に秋田市で発生した食中毒事例で搬入された糞便 (G II/4 型、Accession No.: AB293424) を用いた。

## 2. 試薬類

### 1) 抗 G II/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)

### 2) 食品洗滌液

PBS · 0.1% Tween20

Tris-HCl (pH8.4) · 0.1% Tween20

### 3) パンソルピン

黄色ブドウ球菌を熱処理してホルマリン固定したものの懸濁液で、和光純薬から購入

### 4) 再懸濁液

0.1% Na-Citrate (pH4.2)

### 5) フェノール系 RNA 抽出キット

TRIzol-LS (invitrogen) を使用

### 6) カラム方式の RNA 抽出キット

QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) を使用

### 7) 逆転写反応エンハンサー

RTmate (ニッポンジーン) を使用

### 8) DNase I (RT Grade) 及び RNase inhibitor

ニッポンジーンの製品を使用

### 9) アミラーゼ

$\alpha$ -Amylase Ultrapure (ニッポンジーン) を使用

### 10) 食品処理袋

サニスペックテストバッグ (アズワン) を使用

## 3. パンソルピン・トラップ法の全体の手順

基本的な操作の流れを図 1 に示した。昨

年度のプロトコルからの主な改良点は、次の通りである。本稿では、これらの改良に至った経緯について順次考察を加えていく。

①汚染食品を洗滌液で処理する際に、食品処理袋を使用し、その後の遠心を 30 分行うことで残渣を効率的に除去できるようにしたこと。

②TRIzol-LS によるフェノール抽出の後で、水層にエタノールを添加してそのまま QIAamp Viral RNA Mini Kit に移行できるようにしたこと (詳細は「研究協力報告書: 東方・福井」を参照)。

③逆転写反応の前に DNase I と  $\alpha$ -Amylase 処理を加えたこと。

④逆転写反応のプライマーを特異的プライマー (COG2F/R) に変更したこと (詳細は「研究協力報告書: 東方・福井」を参照)。

## 4. NV の検出

cDNA の合成の前に、最終的に得られた RNA 抽出液 (60 $\mu$ L) から 8.5 $\mu$ L を取り、DNase I 及び  $\alpha$ -Amylase を各 1 $\mu$ L、RNase inhibitor を 0.25 $\mu$ L、5 $\times$ 逆転写 buffer (添付) を 4 $\mu$ L 加えた後、蒸留水で反応量を 15.5 $\mu$ L とし、37 $^{\circ}$ C 10 分、65 $^{\circ}$ C 5 分のインキュベーションを行った。その後、特異的プライマー (COG2F/R)、dNTP、RTmate、及び逆転写酵素を追加して cDNA を合成した (反応容量 20 $\mu$ L)。特異的プライマーとして COG2F と COG2R の両方を加えたのは、引き続いて行われる PCR の際にプライマーの非対称化を避けるためである。合成した cDNA 溶液を 5 $\mu$ L 取り、Kageyama ら (J Clin Microbiol, 41, 1548 ~ 1557 (2003)) のリアルタイム PCR 法で NV を検出した。使用した機器はロシユ製

「LightCycler 350S」で反応容量は 20 $\mu$ L である。

#### 5. Nested PCR への応用

検出感度の向上策として、Nested PCR への応用の可能性を検討した。4 で示した方法の内、特異的プライマーを COG2F/G2-SKR に変更して逆転写を行い、cDNA 溶液を 5 $\mu$ L 取って COG2F/G2-SKR を用いた通常の RT-PCR で予備増幅を行った。予備増幅産物を 5 $\mu$ L 取り、リアルタイム PCR による判定を行った。この場合、機器にはコピー数が表示されるものの、定量性はないため定性と見なした(ゲル電気泳動後にハイブリダイゼーションによる確認を行ったのと同意義)。

### C. 研究結果

#### 1. RNA 抽出キットの比較

汎用されている RNA 抽出キットを糞便検査に用いた場合の増幅曲線を図 2A において比較した。カーブの立ち上がりサイクル数はいずれもほぼ同じである。蛍光強度は糞便検体をそのままカラム精製した場合が最も高く、通常の糞便検査においては適切であることがわかった。一方、汚染されたポテトサラダを PBS で洗滌した後パントラ法を用いて回収した場合の増幅曲線を図 2B に示した。黄色ブドウ球菌の沈澱をキット添付の AVL buffer に懸濁した上清をカラムにそのままアプライしても増幅がほとんど認められず、何らかの改良が必要であることが見て取れる。昨年度のプロトコルで用いたイソプロピルアルコール沈澱による RNA 回収は蛍光強度が高いものの、立ち上がりサイクルに注目すると、TRIzol-LS で抽出した水層をカラムに

アプライする方が早いのがわかる。コピー数として反映されるのは立ち上がりサイクルであるため、感度としては後者が優れている。ただし、蛍光強度が低いままでは低濃度汚染検体において不利になるため、その部分の改良を引き続き行った。

#### 2. 蛍光強度向上へ向けた改良

IgG とパンソルビン(Protein A)との親和性は pH に依存するため、文献に報告されている最適条件である pH8.4 の食品洗滌液を用いてポテトサラダからの回収実験を行ったのが図 3A である。PBS で洗滌した場合と比べて明らかに増幅曲線が改善されているのがわかる。次に逆転写反応の際に添加することで反応効率を向上させるエンハンサー(商品名:RTmate)を使用したのが図 3B である(食品洗滌液は pH8.4 の Tris-HCl)。結果として蛍光強度がさらに増強され、図 2B と比較すると、イソプロピルアルコール沈澱の増幅曲線を上回っているのがわかる。以上のように、食品洗滌液を pH8.4 の Tris-HCl に替え、逆転写時に RTmate を使用することで立ち上がりサイクルと蛍光強度の両方に優れた抽出法とすることができた。

#### 3. 炭水化物の混入対策

昨年度からの検討において、同じ食品であるにもかかわらず、著しく検出効率が悪い場合があり、再現性の問題を解決する必要があった。原因として、食品に多く含まれる炭水化物は物理化学的挙動が核酸(ポリボースが骨格となった複合多糖類)と同じであるため、精製過程で最後まで混入してくることが考えられる。そこで、次の2点において

改良を加えた。

1) 最初の洗滌過程で遠心とスポイト等による分取だけでは、食品残渣を除去しきれないため、その程度によっては検出効率に影響が及ぶ。そこで、食品を洗滌液で処理する際に専用の処理袋(図 4A)を用いることで、残渣の混入を最小限に抑えることとした。この袋は内部にフィルターが付いており、濾過された洗滌液だけをスポイトで取り出すことができるようにデザインされている。こうして回収した洗滌液を改めて 3,000rpm 30 分遠心することで残渣を完全に除去できる。図 1 に示したプロトコルにおいて、カラムにアプライする直前にエタノールを添加するステップがあるが、炭水化物の混入があるとここで沈澱が生じてしまう(図 4B)。この沈澱には核酸が共沈してくるため、安易に除去すると検出効率が落ちることになる。また、懸濁液のままカラムにアプライすると目詰まりを起こすことになる。カラムの説明書に記載されている条件(8,000rpm 1 分)よりも強い条件(15,000rpm 1 分)で遠心すると、とりあえずは最後まで精製作業を継続できるが、最終的な RNA 抽出液に大量の炭水化物が混入することにはかわりはなく、その後の逆転写反応等に影響が出る。図 4C に処理袋の使用の有無を比較したが、その効果は明白である。

2) 食品処理袋の使用により炭水化物を物理的に除去することが可能であるが、より完全な効果を得るため、逆転写反応直前に  $\alpha$ -アミラーゼ処理を行った。この処理は、DNase I 処理と同時に進行することができるため、より精製度の高い RNA を得ることが期待できる。図 5A では効果を確認するために食品処理袋を使わない条件で(大量の炭水化物

が混入している)アミラーゼ処理の有無による増幅曲線比較した。これによると、アミラーゼ処理によって増幅曲線が改善されているのがわかる。図 5B は食品処理袋を使用した場合におけるアミラーゼ処理の効果を見たものであるが、もともとの混入量が少ないため図 5A と比べるとその差は小さい。

#### 4. Nested PCR への応用

パントラ法の開発段階では検出効率等を比較検討する必要があるために、抽出した RNA をそのままリアルタイム PCR で解析している。しかし、実際の検査に用いるようになれば、限界まで感度を高めるために Nested PCR を用いることも視野にいれておく必要がある。図 6 は汚染度を段階的に下げた焼ソバからパントラ法で抽出した RNA に対して Nested PCR を行った増幅曲線である。機器に表示されるコピー数そのものは定性と見なすものの、オリジナルの糞便に含まれる NV のコピー数と希釈率から計算した理論上の検出限界は、焼ソバで 13 コピー/g 食品、ポテトサラダで 44 コピー/g 食品であった。

#### D. 考察

##### 1. 昨年度における課題とその改良

###### 1) カラムによる抽出方式への対応

開発の初期段階では黄色ブドウ球菌の沈澱から NV の RNA を抽出する際に TRIzol-LS 等のフェノール抽出系の試薬で処理し、最後にイソプロピルアルコール沈澱によって回収する方法を用いていた。この方法でも一定の効果は認められたが、作業をより簡便化するために全国的に汎用されているカラム方式のキットへの対応を検討した。

図 2A と図 2B を比較すると、糞便検体で最適な方法がパントラ法でも最適とは限らないことがわかる。また、評価すべきファクターとしてこれまではコピー数のみに注目してきたが、それは増幅曲線の立ち上がりサイクル数のことであり、見かけ上のコピー数が多くとも蛍光強度が低い場合もあることが図 2B から見て取れる。高濃度汚染では検出効率が高くとも、少し汚染度を下げただけで検出できなくなるケースはここに原因があるものと考えられる。図 3A と図 3B に示したとおり、食品洗滌液の pH を Protein A の最適条件である 8.4 とし、さらに逆転写反応のエンハンサーを用いることで、検出効率を落とすことなくカラム方式に適合させることができた。カラム方式におけるより詳細な検討は別稿(研究協力報告書: 東方・福井)を参照されたい。

## 2) 炭水化物の混入対策

炭水化物は核酸と同じ挙動を示すため、除去が困難で結果に影響を及ぼすことは以前から知られていた。したがって、同じ食品であっても炭水化物混入の程度によって再現性に問題が生じることとなる。本研究では、最初の洗滌段階で専用の食品処理袋を使用することで食品残渣を取り除く方法(図 4A、4B、4C)と逆転写反応直前に  $\alpha$ -アミラーゼによって混入した炭水化物を分解する方法(図 5A、5B)について検討した。両者とも効果が認められたが、実用化にあたっては併用するのが現実的であると考えられる。

## 3) 低濃度汚染検体への対応

昨年度の研究報告では、汚染度が下がるほどパントラ法における検出効率が漸減し、従来の PEG 沈澱法の方が良い成績となる場面があった。逆転写時のプライマーをラン

ダムプライマーから特異的プライマーに変更することでこの問題を解決することができたが、その詳細については別稿(研究協力報告書: 東方・福井)を参照されたい。

本稿では、別の視点から Nested PCR に相当する手法について検討を行った(図 6)。あらかじめ、通常の PCR で予備増幅(1st. PCR)を行って、その産物をリアルタイム PCR で解析する方法で、定性試験と割り切ることで、ゲル電気泳動をハイブリダイゼーションで確認したのと同等の効果が見込めるものと考えられる。コピー数が既知の糞便を段階希釈して検出限界を調べたところ食品 1g 当たり換算して、焼そばで 13 コピー、ポテトサラダで 44 コピーの汚染まで検出可能であった。平成 19 年 7 月 18 日付けで、薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会食中毒部会へ提出するための資料としてのアンケート調査が実施されたが、その中で定量値が回答されていたものもあり、生カキで 36.4、38.8、64.6 コピー/g となっている。したがって、パントラ法と Nested PCR を併用することで一般の食品であっても生カキに相当する検出効率が期待できるものと考えられる。

## 4) G II/4 以外の血清型へ対応

開発段階においては状況を単純化するために G II/4 型に的を絞ったが、実用化のためには他の血清型にも幅広く対応させる必要がある。この場合、糞便検査で型を決定してから食品を検査するといったプロセスは時間がかかり過ぎるため行政対応としては現実的ではない。最初の段階で多くの血清型の NV に対応するためには次の 2 通りの方法が考えられる。

### ①ブロードバンドのモノクローナル抗体を



用いる方法：生産と安定供給は比較的容易であるため第一に検討すべき方法である。ただし、Rabbit IgG に比べて Mouse IgG はパンソルビンに対する親和性が弱いため処理条件等を調整する必要がある。

②現在のところ感染研で準備している NV に対する抗血清は、G I については 1,2,3,4,8,11 型の 6 種で、G II については 1-8,10,12,14,15,17 型の 13 種である。理論上はこれらの 19 種類の抗血清を混合使用すれば目的は達成できる。Rabbit IgG であるため、処理条件等は現行のままでも問題ないが、全国的な普及を視野に入れた場合、安定供給に不安が残るのも事実である。

## 2. パントラ法の今後の展開

平成 21 年度の課題は他の血清型への対応が主眼となり、基本的にはブロードバンド・モノクロの使用を検討してゆく。本法は添加する抗体さえあれば NV 以外にも適用可能であるため、サボウイルスや HEV などにも用いることができると考えられる。また、実際に食品検査に用いるようになった場合の効果として、出荷前検査はいかに本法をもってしても限界があり現実的ではない。むしろ、食品から検出する方法を行政機関が所持していることを知らしめることによる食中毒の抑止効果(調理従事者の衛生管理意識の向上)を期待すべきと考えられる。

## E. 結論

カキ以外の一般的な食品からの NV 検出法として、黄色ブドウ球菌を利用したパントラ法の開発に着手した。昨年度の検討では食品の物理的形状を選ばずにどのような検体であっても共通の処理工程で簡便に NV を

減量濃縮することができ、実際の検査の局面で十分に効果を発揮できる可能性は高いと考えられた。今年度は、実用に供するために解決すべき問題点を洗い出し、プロトコルの改良を行った。結果として、カラム方式での抽出が可能となり、結果の再現性に影響を及ぼす炭水化物の除去にも対応した。また、低濃度汚染検体であっても検出効率を維持することができるようになり、完成に向けて大きく前進したと言える。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

佐藤寛子、柴田ちひろ、斎藤博之、安部真理子、山脇徳美：「ノロウイルス抗原キット”クイック Ex-ノロウイルス”の行政検査における有用性の検討、医学検査 (in press)

### 2. 学会発表

斎藤博之、東方美保、田中智之、武田直和：食品からのノロウイルス回収を目的としたパンソルビン・トラップ法の開発、第 56 回日本ウイルス学会学術集会、2008 年 10 月、岡山

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

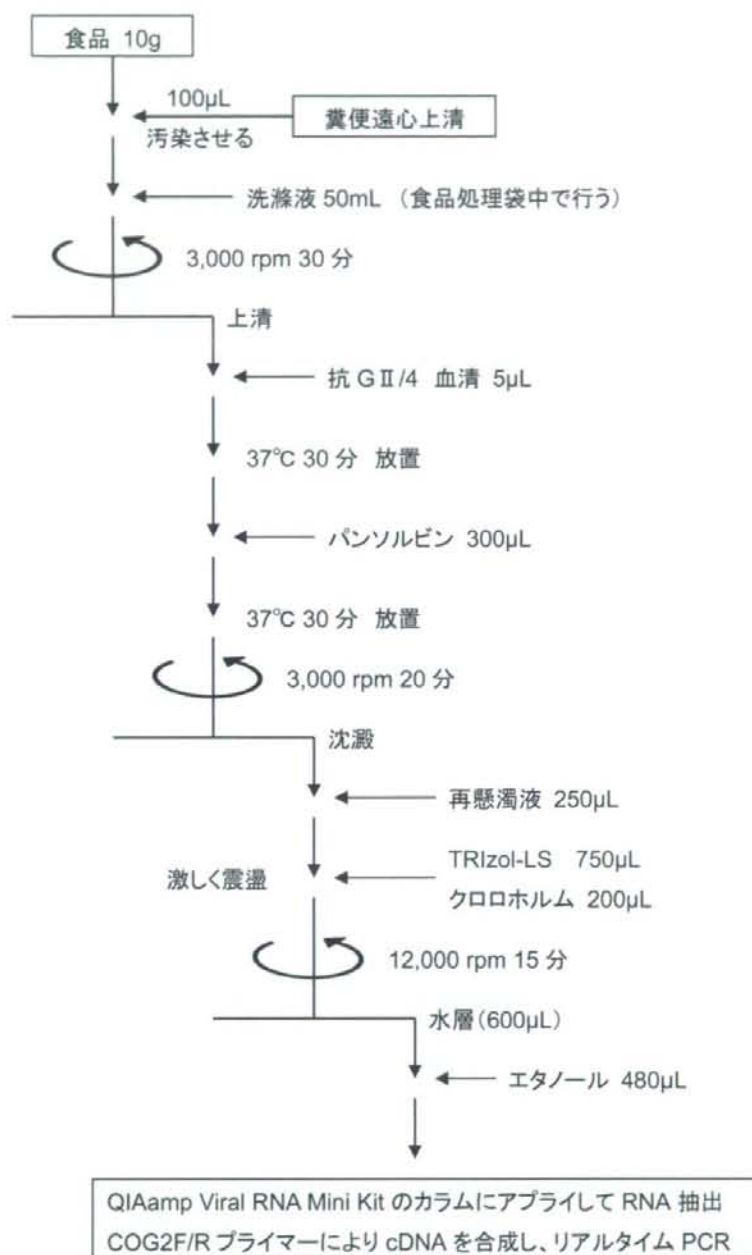


図1 パンソルビン・トラップ法の操作手順 (Ver.2)

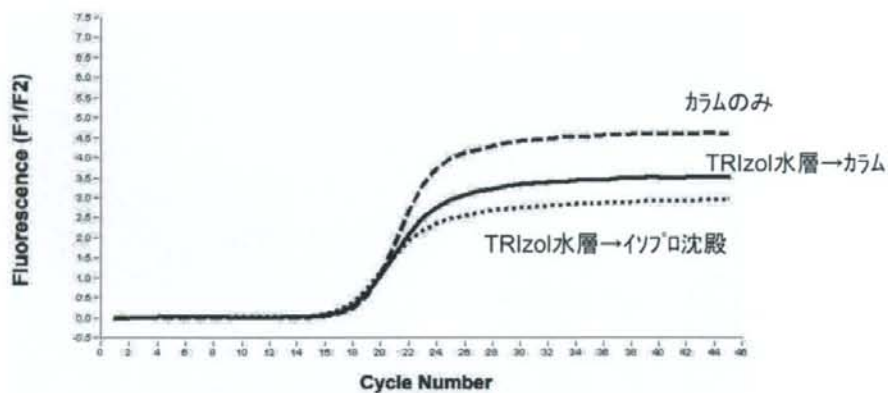


図 2A 糞便検体からの RNA 抽出法の比較 (増幅曲線)

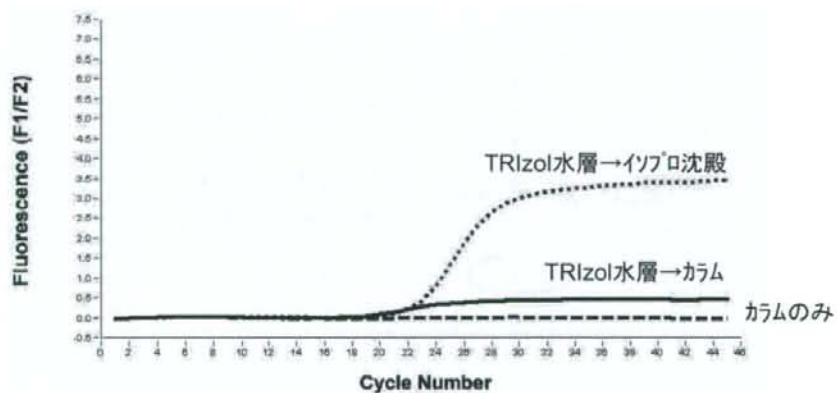


図 2B パンソルビン沈殿 (ポテトサラダ) からの RNA 抽出法の比較 (増幅曲線)

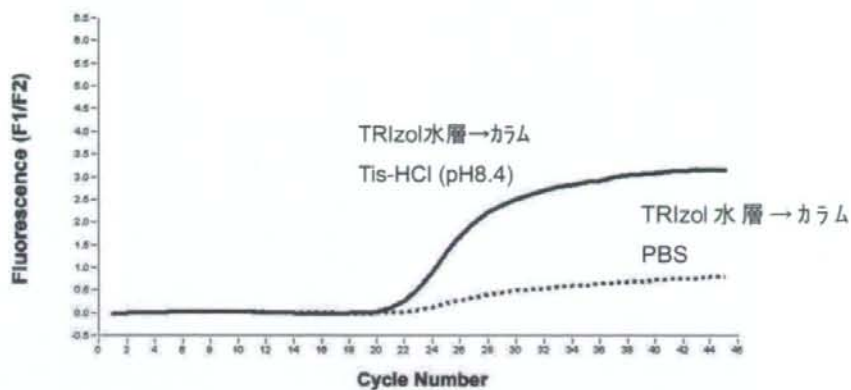


図 3A 食品洗滌液の比較 (増幅曲線)

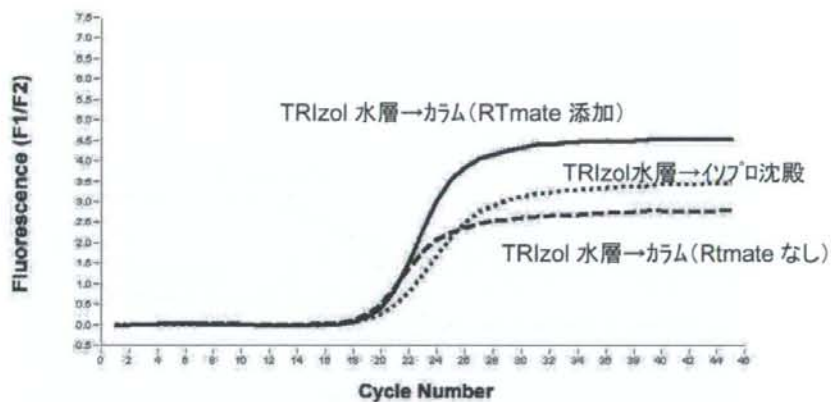


図 3B 逆転写反応エンハンサーの効果 (増幅曲線)