

汚染の実態調査を実施した。

B. 研究材料と方法

1. 材料

1) 添加回収試験供試用ダスト

121°C、15 分間オートクレーブ滅菌し、ふ卵器で乾燥させた NV 遺伝子陰性のダストを添加回収試験に供試した。

2) 添加用 NV

長野県環境保全研究所で食中毒患者の糞便から検出され、Katayama ら (Virology, 299, 225~239 (2002)) の参照株を用いた遺伝子型別により、遺伝子型 GII.4 と決定された NV GII.4 株 (accession no. AB465737) を添加回収実験に用いた。当該供試 NV 株を含む糞便を PBS (-) で希釈し、 10^7 オーダー/ml の NV コピー数を含むように調製したものを添加用ウイルス液とした。

3) NV 汚染実試料

2008 年 4 月に長野県内の結婚式披露宴会場で発生した、NV 集団感染症事例において採取された NV 陽性ダストを、実試料とした。

4) 汚染実態調査用ダスト

一般家庭で使用されている掃除機内のダストを、実態調査用試料とした。なお、当該試料は、本研究の趣旨を理解し、協力を得た者から提供された。

2. 方法

1) 添加回収試験方法

図 1 に添加回収試験の手順を示した。添加回収試験用ダスト 1g を

フィルター付き滅菌ポリバッグに正確に計り取り、添加用ウイルス液 $10 \mu\text{l}$ (10^5 オーダーの NV コピー数を含む) を加え、よく混合した。その後、室温で 2 時間以上放置し、ダストとウイルス液を馴染ませた。放置後、3ml (ダストの 3 倍量) の表 1 に示す 4 種類のウイルス回収用振出し液を加え、時々よく攪拌しながら、室温で一定時間放置した。振出し液を回収し、遠心分離後、上清を RNA 抽出用試料とした。

2) NV の定量方法

RNA 抽出、DNase 処理、逆転写反応および NV 遺伝子の検出と定量は、Kageyama ら (J Clin Microbiol, 41, 1548~1557 (2003)) のリアルタイム PCR 法に準じて行った。なお、添加回収試験は、 $n=3$ で 3 重測定により実施した。

C. 研究結果

1. 各振出し液による NV 回収率の比較

NV 添加ダストに表 1 に示す各振出し液を加え、1 時間放置後の回収率を調べた (表 2)。最も高い回収率を示した振出し液は SDS Tris-Glycine Buffer (SDS-TG) で 59.3%であった。通常使用されている PBS (-) は 28.3%で、滅菌蒸留水は最も回収率が低く 18.2%であった。

2. 回収率の経時的変化

SDS-TG を振出し液に用い、振出し液添加 1 時間後、3 時間後、6 時間後および一夜放置後 (22 時間後) における回収率の変化を調べた。その

結果、1時間から6時間へと振出し時間を長くするとNV回収率は53.2%（1時間後）から71.1%（6時間後）へと増加したが、一夜放置後（22時間後）では34.9%に減少した。

3. NV 汚染実試料を用いた振出し液による回収率の比較

SDS-TG および対照として PBS(-) を振出し液として用い、NV 汚染が確認されている実試料を用いて NV コピー数を比較した。その結果、3検体とも、SDS-TG を用いた方が PBS(-) を用いた場合よりも、NV コピー数が多かった（表4）。

4. 一般家庭におけるダストの NV 汚染実態調査

一般家庭で使用されている掃除機内ダスト 30 検体を試料とし、SDS-TG を振出し液として NV 検出を試みたところ、1検体（3.3%）が陽性であった（表5）。当該陽性ダストの NV RNA 量は、 5.3×10^5 copies/g であった。

D. 考察

野田らは、表面汚染が推定される食品からの NV 検出法に関する検討を行い、SDS-TG 等の SDS が含まれる溶液において、NV 回収率が増加すると報告した（厚生労働省科学研究費補助金 食品の安心・安全確保推進事業 食品中のウイルスに制御に関する研究 平成19年度総括・分担研究報告書、29～34（2008）、第29回食品微生物学会学術総会抄録集、34（2008））。これらの報告から、ダストからの NV 検出におい

ても、振出し液の種類が NV の回収率に影響を与えると考えられることから、今回これらの溶液を中心に回収率を比較した。その結果、ダスト内の NV についても、SDS-TG を振出し液として用いることにより、効率よく NV を回収できる（回収率60%～70%程度）ことが示された（表2）。これまで用いていた PBS(-) と比較すると、約2倍の回収率であった。SDS-TG は、食品表面に付着した NV のみならず、本研究においてダスト内の NV についても、高い回収率を示したことから、当該溶液は NV 汚染の疑われる、調理台、調理器具、手指などの拭取り溶液としても応用可能であると考えられた。

添加回収試験で回収率が高かった SDS-TG を用い、振出し時間の検討を行ったところ、1時間から6時間までは振出し時間を長くすることで回収率が増加したが、一夜放置（22時間）では回収率が減少した（表3）。1時間の振出しでも約60%の回収率が得られたことから、実用的な振出し時間は1時間から6時間が適当であると思われる。一方、野田らの報告（前述）では、食品については2時間放置よりも一夜放置の場合が、回収率が増加すると報告しており、溶出時間については、被検材料ごとに検討する必要があると思われる。

実際に NV が汚染しているダスト 3 検体について、SDS-TG と PBS(-) を用いて NV 検出を試みた結果、いずれも SDS-TG が PBS(-) を用いた場合と比較して、NV コピー数が多かった（表4）。

試料数は少ないものの、添加回収試験を確認する結果になると考えられた。

以上の結果から、振出し液として SDS-TG が有用であると考えられたため、同液を用いて、一般家庭で使用されている掃除機内のダスト中の NV 汚染実態調査を実施した。その結果、30 検体中 1 検体 (3.3%) が NV 陽性 (表 5) で、NV 汚染率は一般には低いものと推定された。また、当該 NV 陽性ダスト 1g あたりのコピー数は、 5.3×10^5 copies であった。ダストから NV が検出された家庭に対して聴き取り調査を実施したところ、当該家庭では、ダスト採取約 2 週間前に家族 4 名中 2 名が相次いで、下痢、嘔吐を発症していたことが判明した。ダストから NV が検出されたことから、これらの発症者は、NV 感染症患者であった可能性が高いと推定された。

今後はさらに、超音波処理を加えるなどによって NV 回収率を高めるための検討を行うとともに、継続してダスト中の汚染調査を行い NV の環境汚染の実態を明らかにしたいと考えている。

E. 結論

掃除機内ダストに NV を添加し、4 種類の振出し液を用いて回収率を比較した結果、SDS-TG が最も高い回収率を示した。

SDS-TG を使用した場合の回収率は振出し時間が 1 時間から 6 時間までは経時的に増加したが、一夜放置では減少した。

NV に汚染されたダストを用い NV RNA を定量した結果、SDS-TG は PBS (-) より高い定量値を示した。

一般家庭のダストについて NV 汚染実態を調査したところ、30 検体中 1 検体 (3.3%) から NV が検出された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 吉田徹也、粕尾しず子、畔上由佳、内山友里恵、薩摩林一代、白石崇、岡智一郎、片山和彦、武田直和：長野県内で発生したサポウイルスによる集団感染性胃腸炎の 2 事例。病原微生物検出情報、29：129-132、2008
- 2) 吉田徹也、粕尾しず子、畔上由佳、内山友里恵、薩摩林一代、白石崇、中沢春幸、園田春美、藤田暁：結婚式披露宴会場で発生したノロウイルスによる集団感染性胃腸炎事例—長野県。病原微生物検出情報、29：196、2008
- 3) 吉田徹也、粕尾しず子、畔上由佳、内山友里恵、薩摩林一代、白石崇：アストロウイルス血清型 8 型の検出—長野県。病原微生物検出情報、30：14-15、2009

2. 学会発表

- 1) 吉田徹也、粕尾しず子、畔上由佳、内山友里恵、薩摩林一代、白石崇、岡智一郎、片山和彦、武田直和：長野県内で発生したサポ

ウイルスによる集団感染性胃腸炎の2事例, 日本ウイルス学会第56回学術集会、2008. 10、岡山県

- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

表1 ノロウイルス添加回収試験に用いた振出し液

振出し液	備 考
滅菌蒸留水 PBS(-)	ニッポンジーン製 (autoclaved, DNase free, RNase free)
SDS Tris-Glycine Buffer 0.05%Tween20 加 PBS(-)	第一化学製 (0.1%SDS, 25mM Tris, 192mM Glycine)

表2 振出し液によるノロウイルス回収率の比較

振出し液	回収率±標準偏差(%)
滅菌蒸留水	18.2±11.4
PBS(-)	28.3±6.8
SDS Tris-Glycine Buffer	59.3±5.9
0.05%Tween20 加 PBS(-)	18.4±14.9

振出し時間は、1時間とした。

表3 ダストからのノロウイルス回収率の経時変化

振出し時間 (hr)	回収率±標準偏差(%)
1	53.2±2.9
3	59.3±9.9
6	71.1±10.2
22	34.9±14.4

振出し液は、SDS Tris-Glycine Buffer を用いた。

表4 ノロウイルス汚染ダストにおける振出し液の違いによる定量値の比較

振出し液 \ 試料 No.	ノロウイルス量 (log ₁₀ (copies/g))		
	20-7-29	20-7-30	20-7-31
PBS(-)	5.47	5.38	5.84
SDS Tris-Glycine Buffer	5.85	5.60	5.96

振出し時間は、1時間とした。

表5 一般家庭のダストにおけるノロウイルス汚染実態調査

調査数	NV 陽性数(%)	備 考
30	1 (3.3)	陽性試料中のノロウイルス量は、 5.3×10^5 copies/g であった。聴き取り調査により、陽性となったダストパックを採取した約2週間前に、家族4名中2名が嘔吐下痢症を発症していたことが判明した。

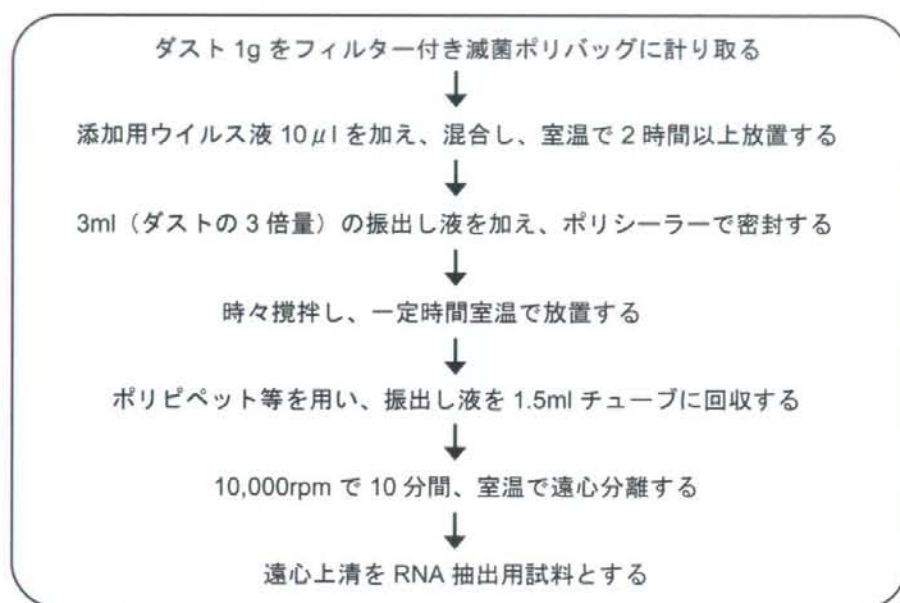


図1 ダストからのノロウイルス添加回収試験手順

平成 20 年度厚生科学研究費(食品の安心・安全確保推進研究事業)
ウイルス性食中毒の予防に関する研究
研究協力報告書

富山県におけるノロウイルス・サポウイルスの検出状況

研究協力者 滝澤剛則 (富山県衛生研究所)

研究協力者 中村一哉、岩井雅恵、小原真弓、長谷川澄代、堀元栄詞、倉田 毅
(富山県衛生研究所)

研究分担者 田中智之(堺市衛生研究所)

研究要旨:

本年度は、富山県西部地域に加えて東部地域の浄水場の下水流入水を調査した。その結果、両地域の浄水場の下水流入水から、一年を通じて様々な遺伝子型のノロウイルスが検出された。下水流入水には、主に不顕性に感染して地域に存在するウイルスが含まれるものと考えられた。GI/4、GII/4 遺伝子型は両浄水場に共通に検出され、それ以外の様々な遺伝子型は、調査年度や浄水場で検出状況が異なっていた。集団感染事例からはGI/4、8、GII/2、4、6、13と多種の遺伝子型が検出され、昨年度のGII/4が大多数を占めた状況とは異なっていた。下水流入水中のノロウイルス由来を探索するために、健常者として調理従事者及び健康乳幼児の検便の調査を行ったところ、調理従事者延べ120人の検便からGII群が1件、乳幼児検便134検体からGII/4、7、13がそれぞれ3、6、8件検出された。サポウイルスは、集団感染事例、健常者からは検出されなかった。

A. 研究目的

昨年度の調査で、下水流入水から多種の遺伝子型のノロウイルス GI、GII 群が検出されることが判明した。このことから、生活廃水が流入する下水中には、感染しているヒトやペットから排泄されたウイルスが多数含まれているものと考えられた。一方、ノロウイルスによる集団感染事例からは限られた遺伝子型のみが検出されたことから、下水から検出される多種の遺伝子型は、不顕性に感染して地域に維持されているものと考えられた。そこで、本年度は、これら下水流入水中のノロウイルスの由来を探索する目的で、

B. 研究方法

1. 下水流入水

今年度は、これまで調査を行っている富山県西部地域の浄水場に加えて、地域差を検討するために、東部地域の浄水場も調査対象に加えた。2008年4月から12月の毎月、両浄水場から下水流入水1リットルを採取した。下水流入水を3,000rpmで30分遠心して得られた上清に最終濃度0.05Mになるように塩化マグネシウムを添加し、0.5規定の塩酸を用いてpH3.5に調整した。この液を陰電荷膜にろ過吸着させた後、陰電荷膜を3%beef extract液10mlに浸漬し、超音波処理により吸着分子を溶出した。溶出液

を再度遠心後、回収される上清を100倍濃縮下水検体とした。上記の方法とは別にPEG沈殿法による濃縮操作により250倍濃縮下水検体も調整した。

2. 集団感染事例

平成20年度に県内で発生した集団発生事例の便検体を検索した。検便は管轄の厚生センター、保健所が行った。

3. 健常者及び健康乳幼児の便

2008年5月、8月、11月、2009年1月に、県内5施設の調理従事者あるいは介護従事者を対象に検便を行った。また、2006年から2008年に行った乳幼児検便の134検体を対象に検索を行った。すべての検体を採取する際、同意書を得た。

4. RT-PCRとクローニングおよび塩基配列解析

便乳剤、濃縮下水検体からQIAamp Viral RNA mini Kitを用いてRNAを抽出した。抽出したRNAについて、DNase処理を行った後、SuperscriptIII逆転写酵素とランダムヘキサマーを用いてcDNAを合成した。ノロウイルスの検出は厚生労働省通知に記載されているプライマー、G1SKF/RまたはG2SKF/Rを用いたPCR法で行い、サボウイルスの検出には、SV-F11とSV-R1プライマー(Okada et al., Arch. Virol., 147:1445-1451, 2002)を用いたPCRを行った。増幅産物については塩基配列解析により遺伝子型の決定を行った。

C. 研究結果

1. 下水流入水

県西部の下水流入水からは、過去2年間にGI、GII群とも多種の遺伝子型が検出された(図1)。今年度は、県西部に

加えて県東部の浄水場でも採水を行い、地域による違いがあるか検討した。両浄水場のいずれの下水流入水からも多種の遺伝子型のノロウイルスが検出されたが(図2)、なかでもGI/4とGII/4は両浄水場に共通して検出され、特にGI/4が高頻度に検出された。過去2年間の県西部の結果でも、GI/4、GII/4が高頻度に検出されていた(図1)。一方、今年度は、GII/4は県東部の浄水場からのみ高頻度に検出され、GI/4、GII/4以外の遺伝子型の検出状況も両浄水場で異なっていた(図2)。過去2年間の県西部の結果でも、GI/4、GII/4以外の遺伝子型の検出状況は、年度によりかなり異なっていたことから、検出される遺伝子型は、浄水場の処理地域、採取年度により影響される可能性のあることが判明した。サボウイルスは過去2年間では複数の遺伝子群・型が検出されたが、3年間を通してGI/1が高頻度に検出された(図1、2)。

2. 集団感染事例

平成20年度に県内で発生したノロウイルスによる集団感染事例について遺伝子型を検討した結果、GI/4が4事例、GI/8が1事例、また、GII/4が8事例、GII/6とGII/13がそれぞれ2事例、GII/2が1事例からそれぞれ検出された(表1)。サボウイルスによる集団感染事例は認められなかった。昨年(2009年)の集団感染事例がGII/13の1事例を除いて、すべてGII/4だったのと異なり、今年度はGI群が2種、GII群が4種と比較的多種の遺伝子型が検出された。また、GII/4のみならずGI/4による事例が比較的多く発生した。推定感染経路は、ヒト-ヒト感染が11事例、食品媒介が3事例と、昨年同様前者による感染経路が多かった。

3. 健康者及び健康乳幼児の便

下水流入水から検出されるノロウイルスの由来を検索するために、健康者として調理従事者、あるいは介護従事者の延べ120検便を行ったところ、1検体からGII群が検出された(表2)。また、健康乳幼児の134便を検索したところ、GII/4、7、13がそれぞれ3、6、8検体から検出された(表3)。乳幼児の1検体を除いて、いずれも冬季の便検体から検出された。特に、乳幼児の便から多数検出されたGII/7、13は、低頻度ながら下水流入水からも検出されており(図1)、不顕性に感染しながら地域に維持されている可能性が示唆された。サポウイルスはいずれからも検出されなかった。

D. 考察

下水流入水中からは、集団感染事例で検出される遺伝子型を含む様々な遺伝子型のGI、GII群のノロウイルスが検出された。それらは、集団感染事例が多発する冬季に限らず、夏季にも検出された。サポウイルスは、集団感染事例からは検出されなかったが、下水流入水から検出された。したがって、下水流入水には、多くは不顕性に感染しながら地域に維持されているノロウイルスやサポウイルスが混入しているものと考えられる。

本年度は、集団感染事例から比較的多種の遺伝子型のノロウイルスが検出されている。それらはこれまでに下水からも検出されていることから、殆ど不顕性であった感染が一部顕性化している可能性が考えられる。なかでも、下水流入水からこれまで高頻度に検出されていたGI/4による集団感染事例が、本年度は比較的多く発生し、一方、昨年度まで大多数を占めていたGII/4が減少傾向を示していることから、GII/4に変化が生じて感染性が変わったために、それ以外

の遺伝子型が顕性化している可能性も考えられる。下水流入水と集団感染事例から検出された遺伝子型の遺伝子配列を詳細に比較検討することが、今後重要と考えられる。

下水流入水から検出されるノロウイルスの遺伝子型の種類には、地域あるいは年度による違いが認められた。その理由のひとつには、ダイレクトシーケンスにより検出しているため、割合の比較的小さい遺伝子型が検出されていない可能性が考えられる。そのため、PCR産物をクローニングすることにより、網羅的に遺伝子型を検出する必要がある。別の理由として、特定の遺伝子型は感染性が低く、一部の地域あるいは集団内に感染が限局するために、浄水場により検出状況が異なる可能性も考えられる。今後、さらに調査を継続し検証していく必要がある。

昨年度の調査で、保育園で発生した集団感染事例から検出されたGII/13が、GII/7由来ポリメラーゼ遺伝子を持つ組換え型であることが判明している。今回の調査で健康乳幼児から多数検出されたGII/7とGII/13も2007年の検便であることから、昨年度にこれらの遺伝子型が多くは不顕性で、同時期、同一地域で感染していた可能性が考えられる。事例と乳幼児から検出されたGII/7、GII/13の配列を詳細に比較検討することにより、この可能性が検証できるものと考えられる。

健康者の便延べ120検体からGII群が1検体検出された。冬季に入ってはじめて検出されたことから、今後さらに検出が増える可能性がある。調査を継続し、感染事例や下水流入水から検出される遺伝子型と比較検討していく必要がある。

E. 結論

富山県西部、東部地域の浄水場の下水流入水からは、一年を通じて様々な遺伝子型のGI、GII群ノロウイルスが検出された。GI/4、GII/4 遺伝子型は両浄水場に共通に検出され、それ以外の様々な遺伝子型は、調査年度や浄水場で検出状況が異なっていた。集団感染事例からはGI/4、GII/4 以外にも比較的多種の遺伝子型を持つノロウイルスが検出された。健康者の検便延べ120検体からは、GII群が1件、健康乳幼児の検便134検体からは、GII/4、7、13 がそれぞれ3、6、8件検出された。サポウイルスは、集団感染事例、健康者からは検出されなかったが、下水流入水からは複数の遺伝子群・型が検出された。下水流入水から検出される様々な遺伝子型のノロウイルスやサポウイルスは、主に不顕性感染により地域に維持されているものと考えられた。

F. 健康権情報

なし

G. 研究発表

1) 誌上発表

1. 岩井雅恵、中村一哉、小原真弓、長谷川澄代、堀元栄詞、倉田 毅、滝澤剛則：下水流入水の腸管系ウイルス調査(2006-2008年)、富山県衛生研究所年報、31、96-103、2008.
2. 長谷川澄代、小原真弓、中村一哉、岩井雅恵、堀元栄詞、倉田 毅、滝澤剛則：ウイルス性胃腸炎の集団発生事例について(2007年度)、富山県衛生研究所年報、31、104-110、2008.
3. 中村一哉、岩井雅恵、張 潔、小原真弓、長谷川澄代、堀元栄詞、倉田 毅、滝澤剛則：環境中のノロウイルスの遺伝

的多様性、富山県衛生研究所年報、31、111-115、2008.

4. Mayumi Obara, Sumiyo Hasegawa, Masae Iwai, Eiji Horimoto, Kazuya Nakamura, Takeshi Kurata, Naohito Saito, Hiroshi Oe, Takenori Takizawa: Single base substitutions in the capsid region of the norovirus genome during viral shedding in cases of infection in areas where norovirus infection is endemic. *J. Clin. Microbiol.* 46, 3397-3403, 2008.

5. Kazushi Motomura, Tomoichiro Oka, Masaru Yokoyama, Hiromi Nakamura, Hiromi Mori Hirotaka 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.

6. Iwai M, Hasegawa S, Obara M, Nakamura K, Horimoto E, Takizawa T,

Kurata T, Sogen S, Shiraki K.:
Continuous existence of noroviruses and
sapoviruses in raw sewage reveals
infection among inhabitants in Toyama,
Japan (2006-2008). Appl. Environ.
Microbiol. in press.

2) 学会発表

1. 中村一哉、岩井雅恵、小原真弓、長
谷川澄代、堀元栄詞、齊藤尚仁、倉田
毅、滝澤剛則:環境に存在するノロウイ
ルスの遺伝的多様性. 第 56 回日本ウイ
ルス学会(岡山市)2008 年 10 月 26 日.

G. 知的財産の出願・登録状況

なし

図1 下水流入水から検出されたノロウイルス、サポウイルスの遺伝子型
(平成18年度～平成19年度)

富山県西部地域

Virus genotype	2006												2007												2008			Frequency of virus detections	
	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sep	Oct	Nov	Dec	Jan	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sep	Oct	Nov	Dec	Jan	Feb	Mar					
NoV	GI.1																											1/24	
	GI.2																												1/24
	GI.4																												15/24
	GI.5																												1/24
	GI.8																												3/24
	GI.11																												1/24
	GI.12																												1/24
	GI.14																												2/24
	GI.3																												5/24
	GI.4																												19/24
	GI.6																												1/24
	GI.7																												1/24
	GI.10																												1/24
	GI.13																												1/24
	GI.14																												1/24
GI.15																												2/24	
SaV	GI.1																											13/24	
	GI.2																											1/24	
	GI.1																											2/24	
	GI.1																											1/24	

■ : ウイルス遺伝子が検出された月

図2 下水流入水から検出されたノロウイルス、サポウイルスの遺伝子型 (2008年)
富山県東部地域

ウイルス	遺伝子型	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	計	
ノロ	GI/3										1	
	GI/4										6	
	GI/8											
	GII/2											
	GII/3										1	
	GII/4											5
	GII/13											1
	GII/15											
サポ	GI/1										4	

富山県西部地域

ウイルス	遺伝子型	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	計	
ノロ	GI/3											
	GI/4										6	
	GI/8										1	
	GII/2										2	
	GII/3											
	GII/4											2
	GII/13											
	GII/15											1
サポ	GI/1										4	

■ : ウイルス遺伝子が検出された月

表1 富山県内で発生したノロウイルスによる集団感染事例（平成20年度）

事例 No.	発生日月	発生施設 原因施設	感染源(推定) 原因食品(推定)	陽性数/検査数	検出ウイルス (遺伝子型)
1	H20.3.26	学校	ヒト-ヒト	14/17	GI/4, GII/13
2	H20.4.1	高校	ヒト-ヒト	1/1	GI/4
3	H20.4.10	老人保健施設	ヒト-ヒト	1/1	GI/4
4	H20.4.30	老人保健施設	ヒト-ヒト	3/4	GI/4
5	H20.5.4	飲食店	食品	13/13	GI/4
6	H20.5.14	小学校	ヒト-ヒト	2/2	GI/8
7	H20.5.23	小学校	ヒト-ヒト	6/15	GI/13
8	H20.11.3	飲食店	食品	5/7	GI/4
9	H20.11.5	家族内	有症苦情	2/2	GI/4
10	H20.11.21	保育所	ヒト-ヒト	5/7	GI/6
11	H20.12.7	飲食店	食品	19/30	GI/4
12	H20.12.7	旅館	有症苦情	6/9	GI/4
13	H20.12.18	幼稚園	ヒト-ヒト	4/10	GI/6
14	H20.12.15	保育園	ヒト-ヒト	2/2	GI/4
15	H20.12.22	家族内	有症苦情	2/2	GI/2
16	H21.1.8	病院	ヒト-ヒト	6/6	GI/4
17	H21.1.18	老人保健施設	ヒト-ヒト	6/8	GI/4

表2 健康者便からのノロウイルス、サボウイルス検出状況

採便年月	検体数	検出ウイルス(人数)		
		NoVG I	NoVG II	SaV
2008年5月	30	-	-	-
2008年8月	30	-	-	-
2008年11月	53	-	-	-
2009年1月	7	-	1	-
計	120	0	1	0

-:検出されず

表3 健康な乳幼児（0～6歳）便からのノロウイルス、サボウイルス検出状況

採便年月	検体数	検出ウイルス(人数)				
		NoVG I	NoVG II/4	NoVG II/7	NoVG II/13	SaV
2006年9月	12	-	1	-	-	-
2007年1月	61	-	2	6	8	-
2007年9月	10	-	-	-	-	-
2008年1月	51	-	-	-	-	-
計	134	0	3	6	8	0

-:検出されず

研究協力報告書

パンソルビン・トラップ法の実用化に向けた改良(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、斎藤らが平成 19 年度から開発に着手したパンソルビン・トラップ法(パントラ法)のさらなる改良について検討した。具体的には、昨年度の研究において検出効率に影響を及ぼす因子として重要と考えられた①逆転写反応時に特異的プライマーを導入することで期待される測定値増加効果 および ②パントラ法に適した RNA 抽出法 に着目し、比較検討を行った。その結果、①ランダムプライマーから特異的プライマーへの変更によりほとんどのケースで測定値の増加(最高 260 倍)が認められ、特に悪影響は確認されなかった。②市販の複数のカラム式 RNA 抽出キットおよびその構成を組み合わせて検討したところ、TRIzol-LS で抽出した水層にエタノールを加え QIAamp カラムで精製する系が、上記①との組み合わせにおいて好成績をおさめた。これらの改良を取り入れることにより、パントラ法における検出効率が大幅に向上した。

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。斎藤らが平成 19 年度から開発に着手したパンソルビン・トラップ法(パントラ法)は、さまざまな形状をとる食品からの効率的な NV 濃縮が期待でき、実用化の可能性も高い。今年度は、昨年度の研究において、検出効率に影響を及ぼす因子として重要と考えられた、逆転写反応時の使用プライマーおよび RNA 抽出法について、比較検討を行った。

B. 研究材料と方法

1. 研究材料

1) 汚染実験に用いる食品

市販されている 8 種の総菜(ナポリタン、マカロニサラダ、ポテトサラダ、まぐろ刺身、鶏五目煮、れんこんの金平、きのこの白和え、ゴボウサラダ)を用いた。

2) 汚染実験に用いる検出対象 NV

昨年度と同様に、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(G II/4 型)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 DW で乳剤とし、その遠心上清を汚染用 NV 原液とした。さらに 10 倍階段希釈で、10・100・1,000・10,000・100,000 倍希釈液を作成した。

これらの汚染用 NV 原液または希釈液を、各食品 10g あたり 70 μ L 加えて汚染させた。また、比較対象として糞便のみ(食品なし)からの測定も行ったが、この場合は上記の汚染用 NV 液 70 μ L に DW を 30~70 μ L 加えたものを、そのまま RNA 抽出用サンプルとした。

2) 汚染食品からのウイルス濃縮

汚染させた食品 10g に対して、食品洗滌液を 50mL 加え懸濁させた後、3,000rpm 30 分間の遠心操作で上清を分取した。食品洗滌液はプロトコール Ver.1(平成 19 年度研究協力報告書:斎藤・秋田)の組成として PBS - 0.1% Tween20、同 Ver.2(本年度分担研究報告書:斎藤・秋田)の組成として 0.1M Tris-HCl (pH8.4) - 0.1% Tween20、及び市販緩衝液である SDS-Tris-Glycine bf.[コスモバイオ]を用いた。こうして得られた上清液からバントラ法または PEG 沈澱法で NV 粒子を回収した。

バントラ法のプロトコールは、昨年度に考案した Ver.1、今年度に食品洗滌液と再懸濁液を改良した Ver.2 の 2 種類を試した。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 5 μ L 加えて 37°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°C で 30 分インキュベートし、3,000rpm

で 20 分遠心した沈澱を、100~140 μ L の再懸濁液(Ver.1 では DW、Ver.2 では 0.1M Na-Citrate(pH4.2))で懸濁して RNA 抽出用サンプルとした。

PEG 沈澱法については、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°C で一晩放置し、9,500 \times g で 20 分遠心した沈澱を、100 μ L の DW で懸濁して RNA 抽出用サンプルとした。

3) RNA 抽出および DNase 処理

バントラ法のプロトコールを検討するにあたっては、TRIzol-LS [invitrogen]でフェノール抽出を行った後に、分取した水層にエタノールを加え、各種のカラム製品を用いて RNA を精製する手法を比較した。本稿で用いたカラム製品は、QIAamp カラム(QIAamp Viral RNA Mini kit[QIAGEN]の構成成分)、及び RNeasy カラム(RNeasy Mini Kit [QIAGEN]の構成成分)であり、TRIzol-LS と組み合わせた抽出法は以下それぞれ、TRIzol-LS+QIAamp、TRIzol-LS + RNeasy と表記する。

それとは別に、通常の糞便検査において現在用いられている標準的な手法も比較対象とした。ここで用いた抽出キットは SV total RNA Isolation System [Promega]、QIAamp Viral RNA Mini Kit [QIAGEN]、および RNeasy Mini Kit (固形物をホモジナイズするオプション QIAshuller を利用) [QIAGEN]の 3 種であり、原則的にキットの添付説明書に従って RNA を抽出した。ただし、沈澱が溶けきらない場合にはカラムの目詰まり

を防ぐため、エタノールを加えるステップの前で、粗遠心をかけて上清のみを分取し、以降の操作を進めた。

いずれのプロトコールにおいても最終段階で、カラムに吸着させたRNAを溶出させることになるが、その際に加える溶出液は60 μ Lに統一した。

精製過程で混入してくるDNAを除去するためのDNase処理については、各キットによって扱いが異なるため次のとおりに行った。SV total RNA Isolation Systemは精製工程にDNase処理が組み込まれているため添付説明書のとおりに行った。RNeasyカラムを用いた場合にはRNase-Free DNase Set [QIAGEN]を適用してカラム上で処理した。QIAampカラムで抽出もしくは精製したRNAについては、逆転写反応の前にDNase I [ニッポンジーン]を用いて処理した。

4) 逆転写反応

10 μ L分のRNAを用い、ランダムプライマー (Nona-deoxyribonucleotide mixture [TaKaRa]を0.2 μ g/ μ Lで使用) または特異的プライマー (COG2FおよびCOG2Rを各0.1 μ Mで使用) による逆転写で20 μ LのcDNAを合成した。

5) コピー数の測定

Kageyamaら[J Clin Microbiol, 41, 1548~1557 (2003)]のリアルタイムPCR法に準じて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(8種)からの回収実験

8種の総菜(ナポリタン、マカロニサラダ、ポテトサラダ、まぐろ刺身、鶏五目煮、れんこんの金平、きのこの白和え、ゴボウサラダ)を汚染用NV原液で汚染し、パントラ法およびPEG沈澱法で濃縮後、TRIzol-LS +RNeasyの系でRNA抽出を行った場合の回収実験結果を、図1-2および表1に示す。

昨年度の実験結果と同様に、PEG沈澱法では品目ごとにバラツキがみられたのに対し、パントラ法では品目によらず一定の回収を見込むことができた(図1-2)。また、汚染食品からのウイルス洗い出し後の遠心条件をより厳しく変更した(3,000rpmで20分→3,000rpmで30分)ことで夾雑物の混入が抑えられたようで、昨年度と比べ高いレベルの測定値が得られ、全ての品目でパントラ法がPEG沈澱法より高い値を示した(表1)。

特異的プライマーを使用することでランダムプライマー使用時と比べ、増幅曲線におけるカーブの立ち上がりが早くなり(図3)、結果として測定値が高くなる効果が確認された。特異的プライマー使用時の測定値は、ランダムプライマー使用時と比較すると、パントラ法で4.5~230倍、PEG沈澱法で2.3~260倍に相当した(表1、比較効率の値は全て上2桁で四捨五入して示した)。

2. 汚染用NV液で段階希釈的に汚染した食品(2種)からの回収実験

昨年度同様、ナポリタンとマカロニサラ

ダについて汚染レベルを低くした場合(原液、10・100・1,000倍希釈)の回収実験結果を、図4および表2に示す。いずれの場合においても、パントラ法がPEG沈澱法より高い測定値を示した。

また、特異的プライマー使用時の測定値は、ランダムプライマー使用時と比較すると、パントラ法で4.5~160倍、PEG沈澱法で1.2~17倍に相当した(表2)。

3. RNA抽出法の比較

1) 糞便検体からのRNA抽出

汚染用NV液そのもの、すなわち糞便検体を抽出対象とする場合と比較すると、図4のとおり、QIAamp Viral RNA Mini Kitが、TRIzol-LS+RNeasyより検出効率において優れていた。QIAamp Viral RNA Mini Kitでは標準プロトコルでCarrier RNAが添加されているので、TRIzol-LS+RNeasyの抽出系としてCarrier RNAを添加した場合と添加しない場合とを設定したところ、ランダムプライマー使用時には違いがみられたものの、特異的プライマー使用時にはほとんど変わらない測定値を示した。

2) 濃縮沈澱(食品なし、パントラ法 Ver.1、PEG沈澱法)からのRNA抽出法の比較

比較した4つのパターンでは、パントラ法で濃縮しTRIzol-LS+RNeasyで抽出するパターンが最も高い測定値を示した(図6)。パントラ法で濃縮し抽出方法が異なる3パターンは、ランダムプライマー使用時での差は小さく、特異的プライマーによる測定値向上効果での差が大きかった。

3) パントラ法沈澱(食品なし、Ver.2)からの

RNA抽出法(特に精製カラム)の比較

今年度の改良プロトコル(Ver.1→2)の条件下で、全国的なQIAamp Viral RNA Mini Kitの普及状況を考慮し、TRIzol-LS+QIAampの抽出系を、2)で最も好成績だったTRIzol-LS+RNeasyと比較した(図7)。ランダムプライマー使用時にはほとんど差はなかったが、特異的プライマー使用時にTRIzol-LS+QIAampがやや高い値を示した。

4) パントラ法沈澱(ナポリタン、Ver.2)からのRNA抽出法、食品洗滌液の比較

汎用されている市販のRNA抽出キットとしてQIAamp Viral RNA Mini KitとSV total RNA Isolation Systemを、3)で好成績だったTRIzol-LS+QIAampの抽出系と比較した(図8)。結果は2)と同様の傾向で、市販キットよりTRIzol-LS+QIAampの抽出系が優れ、特異的プライマー使用時にその差がより大きくなった。

また、マグロ赤身からのNV回収実験で回収効率が高かったとの報告(「平成19年度分担研究報告書:野田衛,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」参照)がある。SDS-Tris-Glycine bf.のpHは8.3で、IgGとパンソルピンとの親和性が最も高まる8.4に近い。そこで、食品洗滌液にこのSDS-Tris-Glycine bf.を用いてTRIzol-LS+QIAampで抽出する系も試してみたところ、Ver.2の正規プロトコルでの結果には及ばないがその差は小さかった。回収効率の影響の大きさによっては、食品洗滌液としての利用が有効かもしれない。

D. 考察

1. 逆転写反応への特異的プライマー導入の効果

昨年度の研究において、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 が混入していることが確認された。特に NV 汚染濃度が低い検討サンプル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高く、ランダムプライマーを用いた場合には競合反応によって NV の RNA の逆転写効率が落ちると考えられた。よって、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黄色ブドウ球菌由来 RNA の影響を排除し、NV の RNA の逆転写効率の向上を図った。その結果、低濃度汚染検体においても検出効率を維持することが可能となり、問題点を解決することができた。

また、比較対象とした PEG 沈澱法で濃縮した場合であっても測定値の増加が確認されたが、その増加率はパントラ法で濃縮した場合の方が高いことが多く、汚染濃度が低くなるほどその傾向は顕著であった(表 1-2)。このことは、黄色ブドウ球菌由来 RNA との競合反応によってランダムプライマーによる逆転写効率が影響を受けるという当初の仮説を裏付けるものである。数少ない測定値低下例は、極めて低濃度の汚染(ランダムプライマー使用時での増幅曲線立ち上がり40 サイクル以降)の場合のみに限られ、原因は不明だが現実的に深刻な悪影響につながるとは考えにくかった。

2. RNA 抽出法の比較検討

今回検討対象とした RNA 抽出法は、操作が簡便で、試料間でのコンタミの危険も低いとされるカラム方式に絞った。しかし汎用されているキットのほとんどが液体からの抽出に特化されており、今回検討したキットのうち固形分からの抽出に対応しているのは、SV total RNA Isolation System と固形物をホモジナイズする QIAshuttle をオプション利用した場合の RNeasy Mini Kit の2種である。また、今回は比較していないが、RNeasy Lipid Tissue Mini Kit [QIAGEN]という製品もあり、原理は QIAzol Lysis Reagent (グアニジンを含むフェノール系 RNA 抽出試薬)で得られた水層を RNeasy カラムで精製するもので、TRIzol-LS+ RNeasy の抽出系にほぼ相当すると考えられる。

パントラ法で濃縮した沈殿からの抽出において、実際に RNA 抽出キットを比較したところ、ランダムプライマー使用時には大きな差は認められなかった。特異的プライマー使用時に測定値が向上するのは共通した傾向だが、その向上の割合が抽出法により異なり、試したうちでは TRIzol-LS+QIAamp や TRIzol-LS+RNeasy の抽出系で特に高く、その他のキットはほぼ横並びと思われる結果であった。

3. 食品種類別によるパントラ法の検出効率

表 1によると、検討した全ての食品においてパントラ法の方が高い測定値を示したが、「まぐろ刺身」や「きのこの白和え」では、その差はわずかだった。こうした表面的な汚染にとどまると考えられる食品

では、食品洗滌液でNVを洗い出し遠心上清として回収した時点で比較的夾雑物が少ないため、PEG沈澱法との差も小さいのであろう。パントラ法がより効果を発揮するのは、練り物や油物といった夾雑物が多く混入する食品の場合だと考えられる。また、全く夾雑物のない「食品なし」の検体において、PEG沈澱法による回収がうまくいかなかったのは、Carrierとなり得る物質(少量の夾雑物)が存在しない状態での沈澱形成もまた困難であることを示している。以上より、食品の種類を選ばず共通の工程で作業ができ、安定した検出効率を得られるパントラ法の有用性が明らかとなった。

E. 結論

食品検体からNVを検出するための実践的な濃縮法として開発が始まったパントラ法について次の2点の改良を加えた。①逆転写反応時に特異的プライマーを導入することで測定値が増加し、低濃度汚染検体においても検出効率を維持できること。②TRIzol-LSで抽出した水層にエタノールを加えQIAampカラムで精製するRNA抽出系が、特に①との組み合わせにおいて有効であること。これらの改良を取り入れることにより、パントラ法で得られる測定値が大幅に向上した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 誌上発表

なし

2. 学会発表

東方美保、斎藤博之、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

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

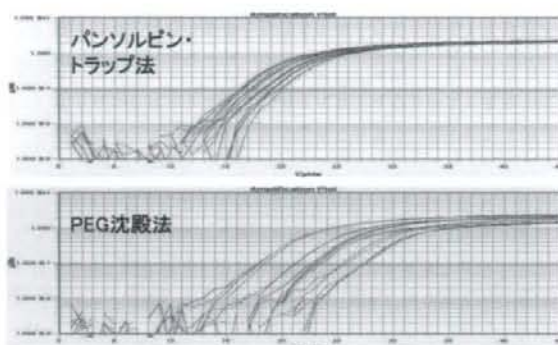


図 1. 汚染モデル食品からのNV回収実験の増幅曲線
(逆転写時に random primer 使用、濃縮別別)

表 1. 食品種類別でのNV測定値(パントラ法 Ver.1、PEG沈殿法)

食品 (汚染用NV液には 原液使用)	パンソルピン・トラップ法 Ver.1 (TRizol-LS +RNeasyカラム精製)			PEG沈殿法 (TRizol-LS +RNeasyカラム精製)			PEG沈殿法を 1としたときの 効率(倍)	
	random primer 使用 (測定値*)	特異的 primer 使用 (測定値*)	random primer を1とした ときの効率 (倍)	random primer 使用 (測定値*)	特異的 primer 使用 (測定値*)	random primer を1とした ときの効率 (倍)	random primer 使用	特異的 primer 使用
ナポリタン	3.9E+05	2.5E+07	64.0	1.5E+05	1.5E+06	10.0	2.7	17.0
マカロニサラダ	8.9E+05	4.0E+06	4.5	2.5E+03	1.7E+04	6.9	360.0	240.0
ポテトサラダ	1.5E+06	7.0E+06	4.7	2.0E+05	4.6E+05	2.3	7.6	15.0
まぐろ刺身	2.6E+05	6.1E+07	230.0	6.8E+04	1.8E+07	260.0	3.9	3.4
鶏五目煮	7.7E+05	1.3E+07	16.0	4.9E+04	3.2E+05	6.5	16.0	39.0
れんこんの金平	5.8E+05	4.9E+07	84.0	6.6E+03	5.8E+04	8.7	87.0	840.0
きのこの白和え	5.1E+05	3.1E+07	61.0	1.3E+05	1.5E+07	120.0	3.8	2.0
ゴボウサラダ	1.2E+06	1.4E+07	11.0	1.2E+03	1.4E+04	11.0	1000.0	1000.0
食品なし	2.4E+06	7.1E+07	30.0	1.3E+04	4.3E+04	3.4	190.0	1600.0

*抽出RNA1 μ Lあたりのコピー数

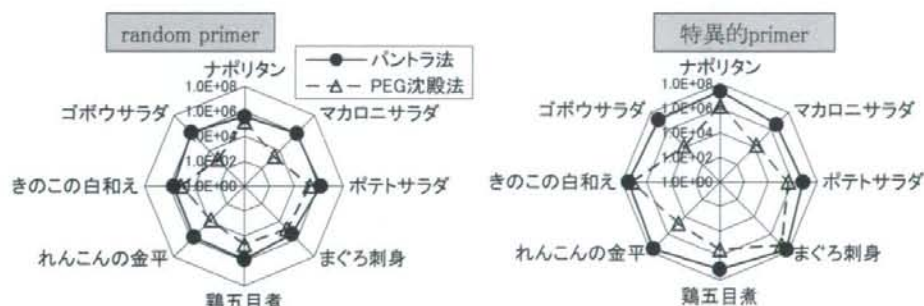


図 2. 汚染モデル食品からのNV回収実験における逆転写 primer による
測定値の違い(パントラ法 Ver.1、PEG 沈殿法)