

表1 二枚貝(カキ)関連食中毒事例からの各種下痢症ウイルス遺伝子の検索結果

発生 年月	事例 No.	検体種類	検体 数	ウイルス検索結果					
				NoVGI	NoVGII	SaV	AiV	AstV	ARotV
2006.12	18-42	患者糞便(有症従事者2名含)	6	1	4	2			
		同一ロットカキ残品 <sup>a</sup>	1						
2008.01	19-33	患者糞便	10	5	7	3	3		
		患者糞便	6	3	5	1	1		
2009.10	21-17	無症喫食者糞便	1	1					
		同一ロット冷凍カキ残品 <sup>b</sup>	8	2	3	4	4		
2010.01	21-35	患者糞便	12	9	3	1			
		検食(調理済みカキ) <sup>a</sup>	1						
		患者等ヒト糞便	35	19	19	6	5	0	0
		同一ロット等カキ	10	2	3	0	4	4	0
		合 計	45	21	22	6	9	4	0

a: 前処理法として、超遠心沈殿法を使用、 b: 前処理法として、アミラーゼ処理直接法を使用

表2 患者等ヒト糞便からの下痢症ウイルス遺伝子の検索結果詳細

事例 No	検体 No	検体区分	症状	カキ喫食	ウイルス検索結果(遺伝子群(型)別)						
					NoVGI	NoVGII	SaV	AiV	AstV	ARotV	CRotV
18-42	18-42-9	従事者	有	有	-	+	-	-	-	-	-
	18-42-10	従事者	有	有	-	+	+(GII)	-	-	-	-
	18-42-11	患者	有	有	+	+	-	-	-	-	-
	18-42-2-1	患者	有	有	-	+	-	-	-	-	-
	18-42-3-1	患者	有	有	-	-	-	-	-	-	-
	18-42-3-2	患者	有	有	-	-	+(GII)	-	-	-	-
19-33	19-33-2	患者	有	有	+	+	-	-	-	-	-
	19-33-3	患者	有	有	-	+	-	+(A)	-	-	-
	19-33-4	患者	有	有	+	-	-	-	-	-	-
	19-33-5	患者	有	有	+	+	+(GII)	-	-	-	-
	19-33-6	患者	有	有	-	+	-	+(A)	-	-	-
	19-33-7	患者	有	有	+	+	-	-	-	-	-
	19-33-8	患者	有	有	-	+	+(GIV)	-	-	-	-
	19-33-9	患者	有	有	-	+	-	+(A)	-	-	-
	19-33-10	患者	有	有	-	-	-	-	-	-	-
	19-33-11	患者	有	有	+	-	+(GII, GIV)	-	-	-	-
	21-17	21-17-1	患者	有	有	-	+	-	-	-	-
21-17-2		患者	有	有	+	+	-	-	-	-	-
21-17-3		患者	有	有	+	+	-	-	-	-	-
21-17-4		患者	有	有	-	+	-	-	-	-	-
21-17-5		その他 <sup>a</sup>	無	有	+	-	-	-	-	-	-
21-17-7		従事者	有	有	+	+	+(GI)	+(A)	-	-	-
21-17-10		患者	有	有	-	-	-	-	-	-	-
21-35	21-35-1	患者	有	有	-	-	-	-	-	-	-
	21-35-2	患者	有	有	+	-	-	-	-	-	-
	21-35-3	患者	有	有	-	+	-	-	-	-	-
	21-35-4	患者	有	有	+	-	-	-	-	-	-
	21-35-5	患者	有	有	+	+	-	-	-	-	-
	21-35-6	患者	有	有	+	-	-	-	-	-	-
	21-35-7	患者	有	有	-	-	-	+(A)	-	-	-
	21-35-17	患者	有	有	+	-	-	-	-	-	-
	21-35-18	患者	有	有	+	-	-	-	-	-	-
	21-35-19	患者	有	有	+	-	-	-	-	-	-
	21-35-20	患者	有	有	+	-	-	-	-	-	-
21-35-21	患者	有	有	+	+	-	-	-	-	-	

a: 患者と同一グループのカキ喫食非発症者

表3 患者等糞便からの下痢症ウイルス遺伝子検出パターン

検出ウイルス数	ウイルス検出パターン	検体数	(%)
1	NoVGIのみ	9	(25.7)
	NoVGIIのみ	5	(14.3)
	SaVのみ	1	(2.9)
	AiVのみ	1	(2.9)
2	NoVGI + NoVGII	7	(20.0)
	NoVGII + AiV	3	(8.6)
	NoVGII + SaV	2	(5.7)
3	NoVGI + SaV(GII) + SaV(GIV)	1	(2.9)
	NoVGI + NoVGII + SaV	1	(2.9)
4	NoVGI + NoVGII + SaV + AiV	1	(2.9)
	不検出	4	(11.4)
	合計	35	(100.0)

表4 事例 No.21-17における推定原因食材(同一ロット冷凍加熱調理用カキ残品)からの下痢症遺伝子ウイルスの検索

検体 No.	ウイルス検索結果(遺伝子群(型)別)						
	NoVGI	NoVGII	SaV	AiV	AstV	ARotV	CRotV
21-17_O-1	+ <sup>a</sup>	- <sup>b</sup>	-	+(A)	-	-	-
21-17_O-2	-	-	-	+(A)	+(T1)	-	-
21-17_O-3	-	-	-	+(A)	-	-	-
21-17_O-4	-	+	-	-	+(T8)	-	-
21-17_O-5	-	-	-	-	-	-	-
21-17_O-6	-	-	-	-	-	-	-
21-17_O-7	+	+	-	-	+(T1)	-	-
21-17_O-8	-	+	-	+(A)	+(T1)	-	-
検出数	2	3	0	4	4	0	0

a: 遺伝子検出、 b: 遺伝子不検出

表5 検出された SaV の遺伝子型別

事例 No.	検出数	検出株数	遺伝子群			
			GI	GII	GIV	GV
18-42	2	2		2		
19-33	3 <sup>a</sup>	4		2	2	
21-17	1	1	1			
合計	6	7	1	4	2	

a: この内 1 検体は、GII 株および GIV 株の両者を検出

表6 検出された AiV の遺伝子型別

事例 No.	検体種類	検出数	遺伝子型	
			A	B
19-33	糞便	3	3	
21-17	糞便	1	1	
	カキ	4	4	
21-35	糞便	1	1	
合計		9	9	

表7 事例 No.21-17 のカキから検出された AstV の遺伝子型別

検出数	遺伝子型(血清型)							
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
4	3							1

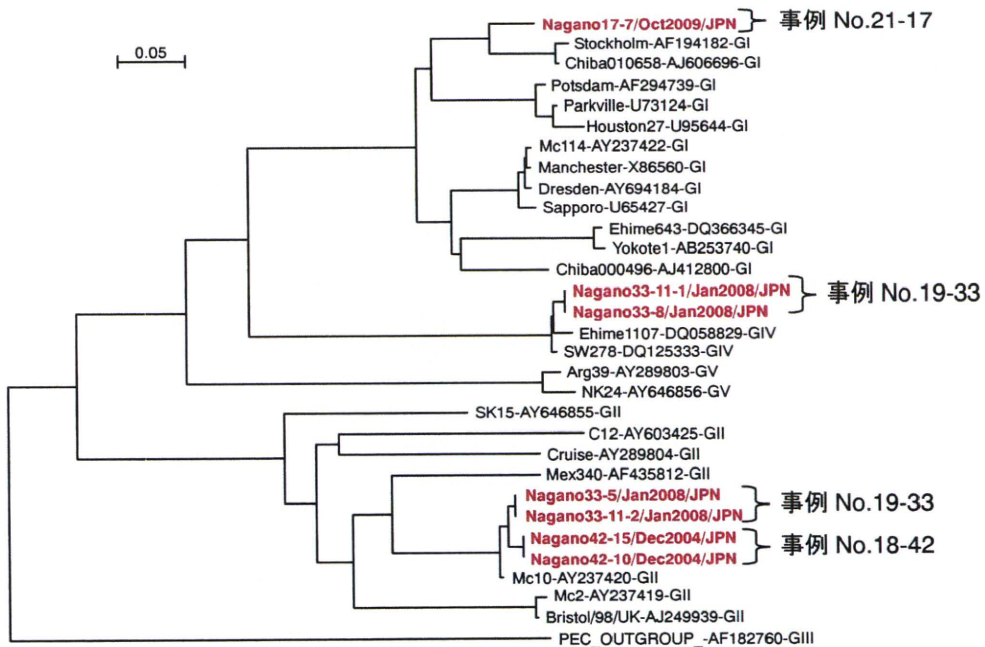


図1 SaV のカプシド領域約 390-nt の系統樹解析結果

検出された 7 株 (赤字) はすべて患者等糞便由来である。

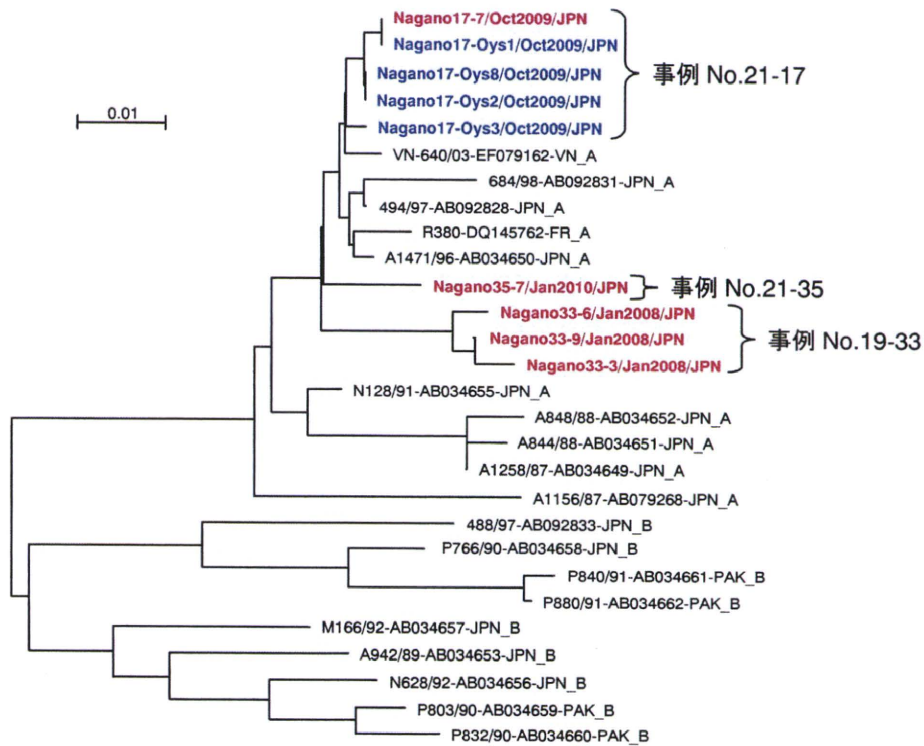


図2 AiV の 3C の C 末端から3D の N 末端領域  
約 480-nt の系統樹解析結果

赤字は患者糞便由来株、青字はカキ由来株を示す。

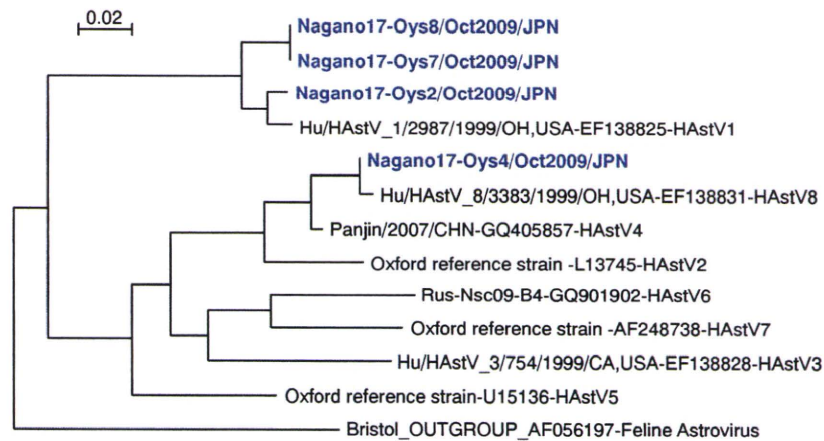


図3 AstV のカプシド領域約 190-nt の系統樹解析結果

4 株(青字)はすべて事例 No.21-17 のカキ由来株である。

平成 22 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)

「食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究」

研究協力報告書

## 生カキが原因食品と疑われた食中毒疑い事例の患者からの Aichi Virus の検出

研究協力者 田村 務 新潟県保健環境科学研究所  
研究分担者 田中 智之 堺市衛生研究所

### 研究要旨

2008 年から 2010 年 3 月までに新潟県内で発生した、生カキ関連が疑われた 7 件のノロウイルスによる食中毒事例（疑い事例を含む）の患者便 29 検体及び患者と同じグループの非発症者便 5 検体について、サポウイルス、アストロウイルス、アイチウイルスについて検索した。7 事例中 2 事例、34 検体中 3 検体からアイチウイルス遺伝子を検出したがノロウイルスは検出されなかった。サポウイルス、アストロウイルスも検出されなかった。

カキが原因食品と疑われる事例では、アイチウイルスについても検索が必要である。

### A. 研究目的

生カキを原因食品とする食中毒は、ノロウイルスや A 型肝炎が知られている。これは、カキが中腸腺にウイルスを濃縮する傾向があるため、これを生食することによって食品由来の感染症が起こっている。ノロウイルスに類似した小型でエンベロープを持たない胃腸炎を起こすウイルスとして、サポウイルスやアストロウイルス、アイチウイルスが知られている。

そこで、生カキを原因とする食中毒事例で、ノロウイルスとサポウイルス、アストロウイルス、アイチウイルスについてウイルス遺伝子検索を行った。

### B. 研究方法

#### 1. 材料

2008 年 1 月から 2010 年 3 月までの間に、新潟県で発生した、7 件の生カキが原因食品と疑われ、病因物質がノロウイルスであった食中毒及び食中毒疑い事例を対象とした。これらの事例の患者便 29 検体、患者グループで喫食歴がある非発症者の便 5 検体を材料とした。

#### 2. 方法

PBS(-)で約 5～10%に溶解した便乳剤 100 $\mu$ l から、ExtragenII(TOSOH)により核酸を抽出した。High capacity RNA to cDNA kit(Applied Biosystems)又は

MMLV-RT(Invitrogen)により、逆転写後、以下のプライマーセットで PCR 反応を行った。使用したプライマーは、以下のとおり。

・ノロウイルス

GI :GISKF or COG1F/G1SKR

GII:COG2F/G2SKR

・サポウイルス

1<sup>st</sup> SV-F13, F14/SV-R13, R14

2<sup>nd</sup> SV-F22/SV-R2

(Okada ら : Arch Virol. 151: 2006)

・アストロウイルス

AC230/AC1'

(Sakon ら : J Med Virol. 61:2000 )

・アイチウイルス

1<sup>st</sup> C1/C2

2<sup>nd</sup> C94b/264k

(Yamashita ら : J. Clin. Microbiol. 38: 2000)

反応後、ゲル電気泳動により特異バンドの確認を行った。

陽性検体については、BigDyeTermi

-nator V3.1 及び ABI3100 遺伝子解析装置 (Applied Biosystems) を使用して塩基配列の解析を行い、Mega3.1 により系統樹解析を実施した。

(倫理面への配慮)

食品衛生法に基づく食中毒調査情報から、個人情報を除き、再検索を行っており、個人の特定ができないよう配慮した。

C. 研究結果

ノロウイルスを病原体とする食中毒疑い事例、7事例のうち5事例は、GI と GII 両方の遺伝子型のノロウイルス遺伝子が

患者グループから検出された(表1)。

ノロウイルスの他、事例4と7の2事例3検体の便からアイチウイルス遺伝子が検出された(表1,2)。

事例4は、患者グループの非発症者を含む喫食者の便を検索した事例である。非発症者5人のうち、1人からノロウイルス遺伝子が検出されているが、他の4人はノロウイルスは陰性であった。このノロウイルス遺伝子が検出されなかった非発症者4人中2人からアイチウイルス遺伝子が検出された。

また、事例7では、胃腸炎を発症した患者で、ノロウイルス陰性の患者からアイチウイルス遺伝子が検出された。

検出されたアイチウイルスの遺伝子系統樹解析結果を図1に示す。アイチウイルスは、遺伝子型Aが2件、遺伝子型Bが1件検出された。事例4の2人から検出された遺伝子型Aの2株のアイチウイルスの遺伝子塩基配列は一致した。

D. 考察

今回検索対象とした事例は、カキが原因食品と疑われた食中毒又は食中毒疑い事例である。ノロウイルス遺伝子が高率に検出されていることから、ノロウイルスの検出状況によって行政判断が可能であった。検出された遺伝子グループも、GI と GII の混合事例が多く、特徴的なノロウイルス遺伝子の多検出型からもカキの関与が推測された。カキは、ノロウイルスを濃縮することが知られており、A型肝炎ウイルスの原因食品と推測された事例もある。そこで、他の近縁なエンベロープを持たない小型球形ウイルスもカ

キに濃縮される可能性が高いことから、サポウイルス、アストロウイルス、アイチウイルス各遺伝子について検索した。

今回、アイチウイルス遺伝子がカキを原因食品と疑われた事例から検出されたことは、アイチウイルスがカキの汚染源となる海水、河川水、下水に存在し、市中での感染者がいることが推測される。アイチウイルスは、カキによる感染事例で検出されていることが多く(Yamashitaら：J Clin Microbiol. 31：1993、山下ら：ウイルス 49：1999)、食中毒でカキが疑われる場合は、今後、アイチウイルスについても検索の必要がある。

アイチウイルスは不顕性感染や症状の弱い感染を起こしていると推測されている(山下ら：ウイルス 49：1999、Reuterら：Rev Med Virol. 21：2011)。今回の検索事例の中でも、胃腸炎を発症していないカキ喫食者からアイチウイルス遺伝子が検出された、不顕性感染と考えられた。

食中毒調査では、患者便からの病原体の検索が主体で、同一グループの非発症者の検索事例は少ない。非発症者においても、アイチウイルスやノロウイルスが不顕性感染を起こしている場合があることから、非発症者の検体を検索することは、共通の暴露を受け、食品由来の感染を起こしたとの裏付けを深める確証として極めて重要である。また、カキが関与すると推測される事例については、喫食者も少ない事例が多いことから、同様に非発症者を含めた検体の確保は不顕性感染の実態をより把握できると考えられる。

## E. 結論

カキを原因食品と疑われた食中毒事例(疑い事例を含む)で、ノロウイルスGI, GIIの他にアイチウイルスが検出された。非発症者を含む喫食者便の検索により、アイチウイルスの不顕性感染者も確認された。カキが原因食品として疑われる事例では、アイチウイルスの検索も重要である。

## F. 研究発表

1. 論文発表  
無し
2. 学会発表  
無し

## G. 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



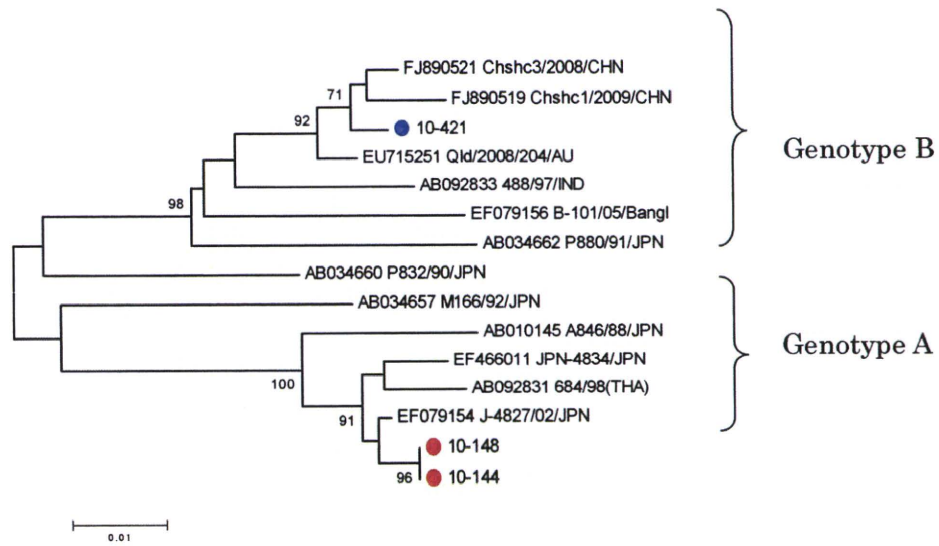
表1 検索した事例におけるウイルスの検出状況

事例番号	推定原因食品	検索検体数	ノロウイルス				アイチウイルス	サポウイルス	アストロウイルス
			ノロウイルス検出数/検索検体数		ノロウイルスの遺伝子型別検出数				
			患者便	同一グループ非発症者便	GI	GII			
1	グリルカキ(加熱不足)	10	9/10		6	4	-	-	-
2	酢カキ	2	2/2		0	2	-	-	-
3	酢カキ	3	3/3		0	3	-	-	-
4	カキ塩辛	9	4/4	1/5	4	1	2/9(2/5 <sup>*</sup> )	-	-
5	生カキワイン漬	1	1/1		1	1	-	-	-
6	酢カキ	4	4/4		2	3	-	-	-
7	酢カキ	5	4/5		3	1	1/5 <sup>**</sup>	-	-

※ 患者と同一グループの非発症者で、ノロウイルス陰性の人の便からのアイチウイルスの検出  
 ※※ ノロウイルス陰性であった患者からの検出

表2 事例4と7におけるノロウイルスとアイチウイルスの検出状況

事例番号	対象検体	ノロウイルス	アイチウイルス
4	患者便1	GI-8	-
	患者便2	GI-4	-
	患者便3	GII-4	-
	患者便4	GI-4	-
	喫食者(非発症)1	GI-4	-
	喫食者(非発症)2	-	genotype A
	喫食者(非発症)3	-	genotype A
	喫食者(非発症)4	-	-
	喫食者(非発症)5	-	-
	7	患者便1	GI
患者便2		GII-4	-
患者便3		GI	-
患者便4		GI	-
患者便5		-	genotype B



10-144,10-148 は事例 4、10-421 は事例 7 の検体

図 1 検出されたアイチウイルス 3CD 領域の塩基配列 (519bp) による系統樹

平成 22 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)  
「食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究」  
研究協力報告書

## カキ中の F フェージプラーク測定法の検討

研究協力者	阿部勝彦	広島市衛生研究所
	山本美和子	広島市衛生研究所
	田中寛子	広島市衛生研究所
	井澤麻由	広島市衛生研究所
	笠間良雄	広島市衛生研究所
	吉岡嘉暁	広島市衛生研究所
研究分担者	田中智之	堺市衛生研究所

### 研究要旨

ノロウイルス等の感染リスクを検証することを目的として、カキ中の F フェージをプラーク法及びリアルタイム PCR で測定した。その結果、50%カキ中腸腺乳剤の原液で、1~46 個のプラークが形成された。プラーク形成フェージはリアルタイム PCR の結果から II 群 F-RNA フェージと推定され、糞便由来の生きたウイルス汚染が示された。

### A. 研究目的

ノロウイルスやサポウイルスなどの食中毒の原因となるウイルスについては、検出系の進歩により微量のウイルス検出が可能になったが、あくまでも遺伝子の検出であるため、生きたウイルスの感染リスク算出を困難にしている。

水環境中におけるウイルスの代替指標として、F 特異大腸菌フェージ (F フェージ) がある。その中で主にヒトの糞便から検出される F-RNA フェージの II 群と III 群をヒトの糞便汚染の指標微生物として用い、カキ中の F フェージを測定することによって、ノロウイルス等の生存性の感染リスクを検証することを目的とする。

### B. 研究方法

#### 1. プラーク法

##### (1) 材料

(a)液体培地: Bacto Tryptone 10g、D(+) グルコース 1g、NaCl 8g、CaCl<sub>2</sub>・2H<sub>2</sub>O 0.3g および MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 0.15g を蒸留水 1L に溶解後、滅菌し用いた。

(b)培養液: 液体培地 20mL にナルジキシン酸溶液 20 μL、およびカナマイシン溶液 20 μL を加え、培養に供した。

(c) F-フェージ感受性菌株の培養: 使用菌株は *Salmonella enterica* serovar Typhimurium WG49(WG49)を用いた。WG49 は *Salmonella enterica* serovar

Typhimurium WG45 に大腸菌の F 繊毛を組み込んだ宿主菌で、F 特異大腸菌ファージに感受性を持つが、体表面吸着大腸菌ファージには感受性を持たず、*Salmonella* ファージには感受性を持つという特徴を有している。一般的に環境水中に *Salmonella* ファージはほとんど存在しないので、WG49 は環境水中から主に F 特異大腸菌ファージを検出することができる。

培養液 20mL に凍結 WG49 菌液を融解して約 1mL 加えて攪拌し、37°C で 3~4 時間振とう培養を行った。

(d) 寒天培地：液体培地 1L に Bacto agar 9g を加えて滅菌後、50 度に保温し、使用直前に、ナルジキシン酸溶液 1mL、カナマイシン溶液 1mL を加え、培養した WG49 を適量加えて使用した。

(e) WG49 の宿主菌としての有効性の確認：培養した WG49 を、宿主菌としての有効性を確認するため、MacConkey Agar を用いてラクトース分解性であり大腸菌の F 繊毛を有していることを確認した。

## (2) 50%カキ中腸腺乳剤

カキ中腸腺 5 個を等量の PBS と  $\alpha$  アミラーゼを添加後、ストマッカー 3 分で乳剤とし、37°C 1 時間インキュベートし、2ml のマイクロチューブに採取後、12000rpm  $\times$  5 分後の遠心上清をその後の検査に用いた。

## (3) ファージ測定手順 (単層寒天培地法)

50%カキ中腸腺乳剤遠心上清 1ml をシャーレに加え、(d)の寒天培地 10mL 程度を添加して十分に混和後、静置凝固させ、37°C 18~24 時間培養し、形成したプラークを計数した。単位は、PFU/mL (Plaque Formation Unit/mL)。

## 2. リアルタイム PCR

50%カキ中腸腺乳剤遠心上清 280  $\mu$ l を出発材量に、キアゲン RNA ミニキットを用いて RNA 抽出し、AVL バッファ 60  $\mu$ l に溶出した。次いでそのうち 50  $\mu$ l を RT 反応に用い、100  $\mu$ l の cDNA を得た。そのうち 5  $\mu$ l をリアルタイム PCR に用い、F-RNA ファージ I 群~IV 群、またノロウイルス (NV) GI、NVG II それぞれのリアルタイム PCR を実施した。

## (倫理面への配慮)

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

## C. 研究結果

### 1. アミラーゼの影響

事前に行った I 群ファージコントロール (MS2) を用いて、アミラーゼ 37°C 1 時間は PFU に影響しなかったため、通常のアミラーゼ直接法による NV 検出と同一材量を用いることとした。

### 2. プラーク法によるファージ測定

カキ 5 検体についてプラーク法でファージ数を測定した結果、4 検体で 1 個~46 個のプラークが原液で形成された。

### 3. リアルタイム PCR でのファージ群別

海域の異なるカキ 5 検体について、ファージ群別プライマーを用いたリアルタイム PCR により、I 群~IV 群別のファージ検出を試みた。2 検体において II 群ファージのみ、1 検体において II 群及び III 群が検出された。それ以外の 2 検体はどのファージも検出されなかった。また、動物の糞便由来といわれる I 群及び IV 群ファージはどのカキからも

検出されなかった。

#### D. 考察

カキ中の F-ファージ測定をプラーク法により検討した。通常の NV 測定に用いているアミラーゼ直接法での試料と同一材料を出発材量にできるか検討したところ、アミラーゼ 37 度はプラーク法に影響しないことがわかった。

カキ 5 検体について、プラーク法により感染性を有した F-ファージを、リアルタイム PCR ではそのファージが人糞便由来であるかどうかを検討した。その結果、50%カキ中腸腺乳剤で 1~46 個のプラークが形成された。46 個のプラークを形成したファージはリアルタイム PCR の結果から II 群と推定され、糞便汚染が示された。しかし、プラーク形成のなかったカキ検体から、リアルタイム PCR では II 群及び III 群が検出された。また、プラーク数 13 個と 1 個を形成したカキ検体は、両検体ともにリアルタイム PCR は陰性であった。この結果から、プラーク形成するファージには RNA ファージだけでなく、DNA ファージが含まれている可能性があり、その確認も必要と思われた。検査に用いたカキは、1 検体を除き全て NV は陽性であった。

プラーク法は宿主となる菌株 (WG49) さえ培養後、凍結保存によりストックしておき、ストック菌株の培養 4 時間後にカキ検体を接種しさえすれば、翌日にはプラーク法の判定ができ、生きたウイルスを測定するには有効で簡便な方法である。しかし、カキ中に含まれる糞便由来 F-ファージは思ったより少なく、プラーク法

でもリアルタイム PCR でも検出できるかどうか、ぎりぎりの量なのかもしれない。さらに感度よく検出するためには、濃度や濃縮方法を検討する必要がある。それでも、NV の培養系が存在しない状態でカキのリスク管理を行うためには、今回のカキ中の糞便由来ウイルスの生存性確認法である F ファージプラーク測定法は有効な検査法となる可能性がある。

#### E. 結論

カキ中のファージ測定をプラーク法により検討した。50%カキ中腸腺乳剤の原液で、1~46 個のプラークが形成された。プラーク形成ファージはリアルタイム PCR の結果から II 群と推定され、糞便汚染が示された。しかし、プラーク形成のなかったカキ検体からもリアルタイム PCR では II 群及び III 群が検出された。同様にプラーク数 13 個と 1 個を形成したカキ検体は両検体ともにリアルタイム PCR は陰性であった。

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

#### G. 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

表

検体	プラーク法			ファージ群別リアルタイム PCR				NVリアルタイム PCR				
	希釈	原液	10-1		I 群	II 群	III 群	IV 群		NV G1	NV G2	
2100020oy	PFU/ml	1	0	(ct値)	NT	NT	NT	NT	実測値 (copy/5 μL)	—	—	
2100019oy		13	0		—	—	—	—		—	—	3.12
4100408oy		NT	NT		—	38	—	—		—	3.47	86.34
4110301oy		46	0		—	37	—	—		—	33.6	63.2
4110401oy		0	0		—	40	39	—		—	7.8	25.4
4110501oy		1	0		—	—	—	—		—	1.3	6.6
2110101F		0	0		—	—	—	—		—	—	$3.52 \times 10^{-4}$ 乗
1100742F		0	0		—	—	—	—		—	—	$1.15 \times 10^{-6}$ 乗

平成 22 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)  
「食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究」  
研究分担報告書

酵素を用いたカキからのノロウイルス濃縮法の検討

研究協力者	植木 洋	宮城県保健環境センター
研究協力者	高橋由理	宮城県保健環境センター
研究分担者	田中 智之	堺市衛生研究所

研究要旨

カキを対象としたノロウイルス (NoV) 検査では、カキ中腸腺やその周辺に付着しているグリコーゲンや脂肪などが、ウイルス濃縮や RNA 抽出を阻害すると報告されており、ウイルス遺伝子の検出が困難である場合が多い。そこで、我々は高感度な NoV 検出法の開発を目的として、ウイルス濃縮行程において $\alpha$ -アミラーゼ(以下 AM)、リパーゼ(以下 LP)、パンクレリパーゼ(以下 PL)を用いた酵素による消化、及び乳剤調製用緩衝液の pH の違いによる NoV 遺伝子検出効果の比較、検討を行った。

その結果、AM によるカキ中腸線の酵素処理と、従来のポリエチレングリコール(PEG)濃縮法を組み合わせた系が他の系と比較し、NoV 遺伝子の検出率、検出値(実測値)共に良好な結果が得られた。一方、LP 及び PL 処理群の検出率は、酵素処理を行わなかった系よりも低かった。

A. 研究目的

2009 年度生食用カキが原因と推定される食中毒が、宮城県をはじめ全国的に増加した。NoV 遺伝子の検出感度を向上させることは、カキを原因とする食中毒のリスクを低減させる上で重要である。そこで我々は、ウイルス濃縮行程に着目し、高感度な NoV 検出法の開発を試みた。

B. 研究方法

1. 材料

1.1 カキ試料

他県産冷凍カキ 69 個(ロット 1: 35 個、

ロット 2: 34 個)及び県内産加熱用カキ 40 個を使用した。

1.2 酵素

糖質を分解する AM(枯草菌由来, 20units/mg 以上, 和光純薬)、脂質を分解する LP(ブタ肝臓由来, 25.9USP units/mg, 和光純薬)及び糖質、たん白質、脂質を分解する PL(ブタ膵臓由来, 和光純薬)を用いた。PL は AM, LP さらにプロテアーゼを含有する酵素であり、各々の酵素活性は AM 100units/mg, LP 24units/mg, Protease 100units/mg である。

1.3 乳剤調製用緩衝液

AMの至適 pH7.45 リン酸緩衝液, LPとPLの至適 pH9.0 グリシン緩衝液を作製し, それぞれの緩衝液と供試酵素を加え比較, 検討した。

## 2. 方法

カキ中腸線は無菌的にハサミで中腸腺を摘出し, 中腸腺 2 個を 1 検体とした。検体重量の 9 倍量の緩衝液を加え, ストマッキングにより 10%乳剤を作製した。

AMは 2.5mg/ml, LPとPLは 10mg/ml となるように酵素を添加した。37°C, 1 時間消化後, 8,000×g, 20 分遠心分離した上清を分取し PEG と NaCl をそれぞれ最終濃度 0.12g/ml, 0.058g/ml となるように加え, 完全に溶解させた。次に, 8,000×g, 30 分遠心分離し, 沈渣を 400 μl の 0.5% Zwittergent で再浮遊させ RNA 抽出材料とした。遺伝子検査は, 公定法に従い定量 PCR 法により行った。

### (倫理面への配慮)

本研究では, 特定の研究対象者は存在せず, 倫理面への配慮は不要である。

## C. 研究結果

### 1. 他県産冷凍カキ

他県産冷凍カキの NoV 遺伝子検出結果を示した(表 1)。AM 処理でのみ遺伝子が検出されており, pH9.0 では G1 群 37.5% (3/8), G2 群 25% (2/8), pH7.45 では G1 群 40% (2/5), G2 群 60% (3/5)であった。また, pH7.45 において 2well (duplicate) とともに遺伝子が検出された検体が 2 件あった。

### 2. 県内産加熱用カキ

県内産加熱用カキの NoV 遺伝子検出結果を示した(表 2)。酵素処理を行わなかった

系と AM 処理では, 5 検体すべて duplicate で NoV G2 群が検出された。また, G1 群は AM 処理でのみ 40% (2/5) 検出された。一方, LP 処理においては G2 群が検出された検体が 1 件にとどまった。

## D. 考察

今回の実験の結果, 使用した緩衝液の pH に依存せず, NoV 遺伝子の検出率, 検出値 (実測値) 共に AM 処理が最も高かった。一方, LP 処理, PL 処理は酵素処理を行わなかった系と比較しても検出率が低く, LP 処理, PL 処理が PEG による濃縮または RNA 抽出にマイナスの影響を与えたことが示唆された。

## E. 結論

今回の結果より, AM 処理と PEG 沈澱法を組み合わせた方法が, ウイルス濃縮に有効であることが示された。

一方, LP 処理については, 今回の実験においては濃縮効果が確認されなかったが, カキからのウイルス濃縮に効果があることが報告されている(奥村ら)。特に脂肪が蓄積される春季のカキでは, 効果が高いことを確認している。

今回の実験において, AM 処理と LP 処理及び PL 処理の間に, 顕著な検出率の差が出た原因については不明である。今後これらの原因を解明し, 検出感度の向上に繋げたい。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表



なし

**G. 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

表1 NoV 遺伝子検出結果（他県産冷凍力キ）

ロット	検体 番号	pH	酵素処理なし		AM処理		LP処理		PL処理	
			G1	G2	G1	G2	G1	G2	G1	G2
1	1	9.0	-	-	-	-	-	-	-	-
	2		-	-	0.52	1.5	-	-	-	-
	3		-	-	-	-	-	-	-	-
	4		-	-	0.53	-	-	-	-	-
	5	7.45	/		-	-	/		/	
	6		-	-	0.58	1.1	-	-	-	-
	7		-	-	-	0.24	-	-	-	-
2	1	9.0	-	-	-	-	-	-	-	-
	2		-	-	-	-	-	-	-	-
	3		-	-	0.43	1.2	-	-	-	-
	4		-	-	-	-	-	-	-	-
	5	7.45	/		-	0.36	/		/	
	6		-	-	0.46	-	-	-	-	

表2 NoV 遺伝子検出結果（県内産加熱用力キ）

検体 番号	pH	酵素処理なし		AM処理		LP処理		PL処理	
		G1	G2	G1	G2	G1	G2	G1	G2
1	7.45	-	3.7	-	19	-	-	-	-
2		-	1.6	-	13	-	-	-	-
3		-	2.8	-	17	-	-	-	-
4		-	1.3	13	30	-	0.77	-	-
5		-	1.2	15	23	-	-	-	-

網掛けは duplicate で遺伝子が検出されたことを示す  
数字は実測値(copy/ $\mu$ l cDNA)

非晶性リン酸カルシウム微粒子を用いたウイルス濃縮法の検討  
—すし及びサラダ材料からのウイルス回収—

研究協力者 篠原 美千代 埼玉県衛生研究所

研究分担者 田中 智之 堺市衛生研究所

研究協力者：内田和江、島田慎一、富岡恭子、鈴木典子、峯岸俊貴、  
河橋幸恵（埼玉県衛生研究所）

研究要旨

水中や食品中のウイルスを短時間で簡便に濃縮でき、かつ特殊な試薬や装置を必要としない方法の構築を目的として、非晶性リン酸カルシウム（Amorphous calcium phosphate：ACP）微粒子を用いたウイルス濃縮方法（ACP 微粒子濃縮法）を検討した。千切りキャベツ、カットレタス、スライスハム、マグロの刺身および白飯を検討材料とし、ネコカリシウイルス（FCV）を用いて添加回収実験を実施した。また、10 倍段階希釈した FCV を添加して検出限界を調査した。この結果いずれの食品からも効率良くウイルスを回収することができた。さらに、キャベツ、レタス、ハムでは 10 g あたり  $10^3$  コピーの添加ウイルスまでリアルタイム RT-PCR で検出可能であった。以上の結果から ACP 微粒子濃縮法は食品からのウイルス濃縮に利用可能であることが判明した。

A. 研究目的

ノロウイルス（NV）は、冬季を中心に発生するウイルス性食中毒の主要な病原体である。国内における食中毒の原因食品としては、カキを含む二枚貝のほか、寿司、さしみ、サラダなどの手指による調理でそのまま喫食する食品が多い。一方、諸外国では、レタス等の生鮮野菜や冷凍ラズベリーを原因とする食中毒の広域発生が複数報告されている。また、NV は、環境中では容易に不活化されず長期間感染性を保持することから水系感染も

引き起こしている。このような状況において、食中毒における感染経路の推定や原因究明のための水や食品からのウイルスの検出、さらに広域食中毒の発生予防のための広域流通食品のウイルスモニタリングが期待されている。しかし、水や食品中のウイルス量は一般に微量であること、食品成分がウイルス濃縮を阻害すること、また食品中の酵素反応阻害物質が遺伝子増幅反応を阻害することなどから、これらの検体からのウイルスの検出は極めて困難で、その検出報告例も少ない。

そこで、本研究では、短時間で簡便に実施でき、かつ特殊な試薬や装置を必要としないウイルス濃縮方法の構築を目的として、ACP 微粒子を用いたウイルス濃縮方法の検討を行った。

## B. 研究方法

### 1. 検討材料

寿司およびサラダを想定し、その材料となる白飯、まぐろの刺身、カットレタス、千切りキャベツ、スライスハムを検討の対象とした。これらの食品は、スーパーマーケット及びコンビニエンスストアから購入した。食品サンプルは 10 g ずつに小分けし、キャベツ、レタス以外は  $-20^{\circ}\text{C}$  に保管した。キャベツとレタスは冷蔵保管し、購入後 1、2 日中に実験に使用した。

### 2. 添加ウイルス

Crandell Reese Feline Kidney (CRFK) 細胞で培養した Feline calicivirus F9 株 (FCV) を添加ウイルスに使用した。CRFK 細胞は 10% ウシ胎児血清 (FBS)、0.03% グルタミン、0.2% 重炭酸ナトリウムを含む Eargle's minimum essential medium (MEM) を用いて、炭酸濃度 5.0%、湿度 99.9%、温度  $37^{\circ}\text{C}$  の条件で培養した。ウイルス接種後は FBS 濃度を 1% にした維持培地で培養した。CPE が最大になった時点で培養上清を回収し、10 倍希釈し小分けして  $-80^{\circ}\text{C}$  に保管した。

### 3. 食品検体の人工的ウイルス汚染

食品サンプル 10 g に FCV  $4.5 \times 10^4$  -  $7.5 \times 10^4$  コピーを添加し、1 時間室温に放置し乾燥した。

### 4. ウイルス濃縮方法

ウイルスで汚染させた食品サンプルをストマッカーバッグに移し、食品洗浄液 40 ml (レタスでは一部 80 ml) を添加して 10 分間振とうした。食品洗浄液には PBS (-)、超純水、pH 3.0 あるいは pH 9.0 になるように塩酸を添加した超純水、Tris-glycine 液 (pH 9.5) (100 mM Tris、50 mM glycine) を用いた。テトロンメッシュ (100 メッシュ) でろ過後、ろ液を  $1880 \times g$  で 30 分遠心し、上清をフラスコあるいは 50 ml コニカルチューブに移した。ここに ACP 粒子 (積水化成品工業株式会社、大阪) 0.3 g を添加し 1 時間攪拌した。 $1880 \times g$  で 10 分遠心した後、上清を捨て、集めた ACP 粒子を 3.3 M クエン酸 3 ml で溶解した。

さしみはストマッカーバッグに移し、3% ACP 粒子懸濁液 10 ml を添加し、さしみによく行き渡らせた。次に食品洗浄液 30 ml を添加し 1 時間振とうした後、メッシュろ過した。ろ過後のバッグ内を 10 ml の洗浄液で洗い、メッシュを通して前述ろ液に合わせた。ろ液 40 ml を  $1880 \times g$  で 10 分遠心し、ACP 粒子を集め、3.3 M クエン酸 3 ml で溶解した。

### 5. ウイルス RNA の抽出方法

ACP 粒子溶解液 140  $\mu\text{l}$  から、QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) を用いて、操作説明書に従いウイルス RNA を抽出した。カラムからの RNA 溶出には Diethylpyrocarbonate 処理水 60  $\mu\text{l}$  を用いた。

### 6. 逆転写反応

逆転写反応 (30  $\mu\text{l}$ ) は抽出 RNA 15  $\mu\text{l}$ 、0.5 mM 各 dNTP、0.5 mM dithiothreitol、