

2.5  $\mu$ M random hexamers、30 units RNasin inhibitor (Promega)、300 units Superscript II RNase H(-) reverse transcriptase (Invitrogen)、50 mM Tris-HCl(pH 8.3)、75 mM KCl、3 mM MgCl<sub>2</sub>の組成で、42°C、1時間反応させた後、98°C10分の加熱で酵素を不活化した。

#### 7. リアルタイム PCR によるウイルスゲノムコピー数の測定方法

森ら(感染症学雑誌、vol. 80、2006)が報告した方法で実施した。標準曲線は、FCV F9株の塩基配列の4462-4548塩基(DDBJ accession number M86379)を合成し、10倍段階希釈( $10^0 - 10^7$  コピー/ $\mu$ l)したものを用いて作成した。

#### 8. 検出感度の検討

ACP粒子濃縮法の検出感度を決定するため、食品サンプル(キャベツ、レタス、ハム)10gにFCV  $4.5 \times 10^3 - 4.5 \times 10^2$  コピーを添加し、1時間乾燥後、PBS(-)を用いて、前述のとおりウイルス濃縮操作を行った。ハムではACP粒子添加前にアスコルビン酸1.0gを加えた。

#### (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. 濃縮方法の検討

各食品からのウイルス回収状況を表1に示した。洗浄液としてPBS(-)を用いた場合、キャベツでは平均32%、レタスで平均50%が回収された。また、キャベツでは洗浄液をTris-glycine液にした場

合に回収率が低下する傾向が見られたが、統計的には有意な差ではなかった。一方、レタスではTris-glycine液を使用した場合に、キャベツとは反対に回収率が向上する傾向が見られたが、こちらも有意な差ではなかった。

次に、ハムでは洗浄液としてPBS(-)、Tris-glycine液、超純水のいずれを使用しても、ウイルスは回収できなかった。しかし、アスコルビン酸を添加することにより、ウイルス回収は可能となった。検討の結果、アスコルビン酸添加量が0.2g、0.5g、1.0gと増加するにつれ、回収率も13%、20%、45%と向上した。しかし、2.0gの添加では、アスコルビン酸によるACP微粒子の溶解が起こり、回収率は下がった。以上の結果より、アスコルビン酸1.0g添加時の回収率は他の添加量における回収率に比べ有意に高いことが判明した( $p < 0.01$ )。

白飯ではTris-glycine液を使用した場合に回収率が向上する傾向が見られた。

刺身ではPBS(-)を用いた場合の回収率は11%であったが、pH3に調整した超純水を洗浄液に用い、刺身とACP微粒子を一緒に攪拌すると52%と高い回収率が得られた。

#### 2. キャベツ、レタス、ハムにおける検出感度

キャベツ、レタス、ハムを用いて検出感度の検討を行った結果を表2に示した。いずれの食品でもサンプル10gに対してFCV  $4.5 \times 10^3$  コピーの添加までは検出が可能であった。しかし、 $4.5 \times 10^2$  コピー添加時は実測値が1未満となり、リアルタイムPCRでは不検出の判定となった。

本研究における検討結果から構築した ACP 微粒子濃縮法の操作手順を図 1 に示した。

#### D. 考察

食中毒においてノロウイルスが関与する事例は増加してきており、原因食材も多岐にわたっている。中でも、加熱せずに食べることの多い食品、たとえば野菜、果物、ハム、寿司などが原因食材となることが多い。原因食材の特定のために、疫学的な情報が重要であることはもちろんであるが、ウイルス学的な根拠が求められている。また、野菜やベリー類は下水で汚染された水による灌漑や洗浄過程でのウイルス汚染、ウイルスに感染した従業員によるパッケージングや調理等、生産から消費まで様々な工程でウイルス汚染を受ける可能性があることから、これらの食品における腸管系ウイルスのモニタリングは食中毒予防のために重要な情報と考えられる。

本研究では生で摂食されることの多いキャベツ、レタス、ハム、マグロの刺身および白飯を用いてウイルス濃縮方法について検討した。まず、レタスおよびキャベツからのウイルス回収に使用する 3 種の洗浄液を比較した。野菜や果実からのウイルス誘出のための洗浄液にはビーフエキス加 Tris-glycine 液が最適であるという報告があるため、事前にこの洗浄液を用いて実験したところ、本法では攪拌時に泡立ちが激しく、ウイルスが全く回収できないという結論を得た。また、消泡剤を用いた場合にも全くウイルスの回収はできなかった。そこで、泡立ちの原因であるビーフエキスを除いた

Tris-glycine 液を検討洗浄液に加え、実験を行った。レタスにおいてはどの洗浄液を用いても高い回収率が得られ、特に Tris-glycine 液を用いた場合の回収率は高い傾向が見られた。しかし、統計的には他の洗浄液を用いた場合との間に有意な差があるとは認められなかった。逆に、キャベツにおいては Tris-glycine 液による回収率は低い傾向であったが、他の洗浄液との間に有意差は認められなかった。レタス全体の回収率は 60%、キャベツ全体の回収率は 28% で、両者に有意差が認められた ( $p < 0.01$ )。この回収率の差には、千切りキャベツの細胞が大きく破壊され、レタスよりも内容物が放出されやすい状態であったことが影響していると考えられた。ウイルス検出を阻害する食品成分についてはいくつかの報告がある。このうち、レタス中に何らかの遺伝子増幅反応阻害成分が存在しているという報告は多い。しかし、本研究では、レタスからのウイルス回収率は 60% と高く、遺伝子増幅反応の阻害は見られなかった。植物中の遺伝子増幅阻害物質については、酸性ポリサッカライドの中には、強い阻害作用をもつものがあるとの報告がある。本研究で用いたキャベツはペクチン含有量の高い野菜であるといわれており、これがレタスに比べウイルス検出率を低下させる原因の可能性もあると推測された。

ハムからのウイルス回収に関する実験の結果では、アスコルビン酸の添加が必要であることが判明した。アスコルビン酸を添加しない場合には定量限界値以下であったが、アスコルビン酸を 1.0 g 添加することにより、回収率は大幅に改善し

45%となった。また、リアルタイム RT-PCR では  $4.5 \times 10^3$  コピーのウイルス添加まで検出することができた。なお、アスコルビン酸はウイルスの ACP 微粒子への吸着過程ではなく、抽出操作以降に作用していることを別途確認した。

刺身からのウイルス回収では、刺身と ACP 微粒子を一緒に攪拌することにより回収率が大きく改善することが判明した。

今後、種々の食品について本法を応用し、本法の有用性と課題を検討していく予定である。

## E. 結論

本研究の結果、新たに構築した ACP 微粒子濃縮法を用いることにより、キャベツ、レタス、ハム、マグロの刺身および白飯からウイルスを効率よく濃縮できることが判明した。また、キャベツ、レタス、ハムでは共に 10 g あたり  $4.5 \times 10^3$  コピーの FCV 添加までリアルタイム RT-PCR で検出することが可能であった。遺伝子増幅反応阻害物質が多いと報告されているレタスについても、本法では問題なく検出が可能であった。ハムではアスコルビン酸の添加によりウイルスを高率に回収することが可能となった。また、刺身では ACP 微粒子と食品を一緒に攪拌することにより、回収率の改善が可能で

あった。

食中毒の原因となる食品は多種多様で、その性状もさまざまである。これまでに報告されている濃縮法も適用可能な食品が限定されており、食品の種類を問わずに十分な回収率を得ることができる方法はないのが現状である。本法においても、食品によっては操作法を変更する必要があると予測される。今後、本法を種々の食品に応用し、適用可能な食品群を検討していく必要がある。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

篠原美千代、内田和江、島田慎一、富岡恭子、鈴木典子、峯岸俊貴、河橋幸恵、大橋典男：非晶性リン酸カルシウム微粒子を用いた食品からのウイルス回収法の構築、第 58 回日本ウイルス学会学術集会、2010 年 11 月、徳島

## 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 各食品における平均ウイルス回収率 (%)

食品	PBS(-)	Tris-glycine	超純水	超純水 pH 3
キャベツ	32	21	27	nt
レタス	50	85	51	nt
ハム	neg <sup>c</sup>	neg	nt	neg
ハム <sup>a</sup>	45	nt	nt	nt
刺身	11	0.6	nt	nt
刺身 <sup>b</sup>	nt <sup>d</sup>	nt	24	52
白飯	14	32	12	nt

a アスコルビン酸 1.0g を添加.

b 刺身と ACP 微粒子を一緒に攪拌.

c negative.

d not tested.

表2 キャベツ、レタス、ハムからのウイルス検出感度

食品検体	添加ウイルス量 (copy)	陽性検体数 / 検査検体数	平均 回収率
キャベツ	$4.5 \times 10^3$	4 / 4	33
	$4.5 \times 10^2$	0 / 4	
レタス	$4.5 \times 10^3$	4 / 4	55
	$4.5 \times 10^2$	0 / 4	
ハム	$4.5 \times 10^3$	4 / 4	37
	$4.5 \times 10^2$	0 / 4	

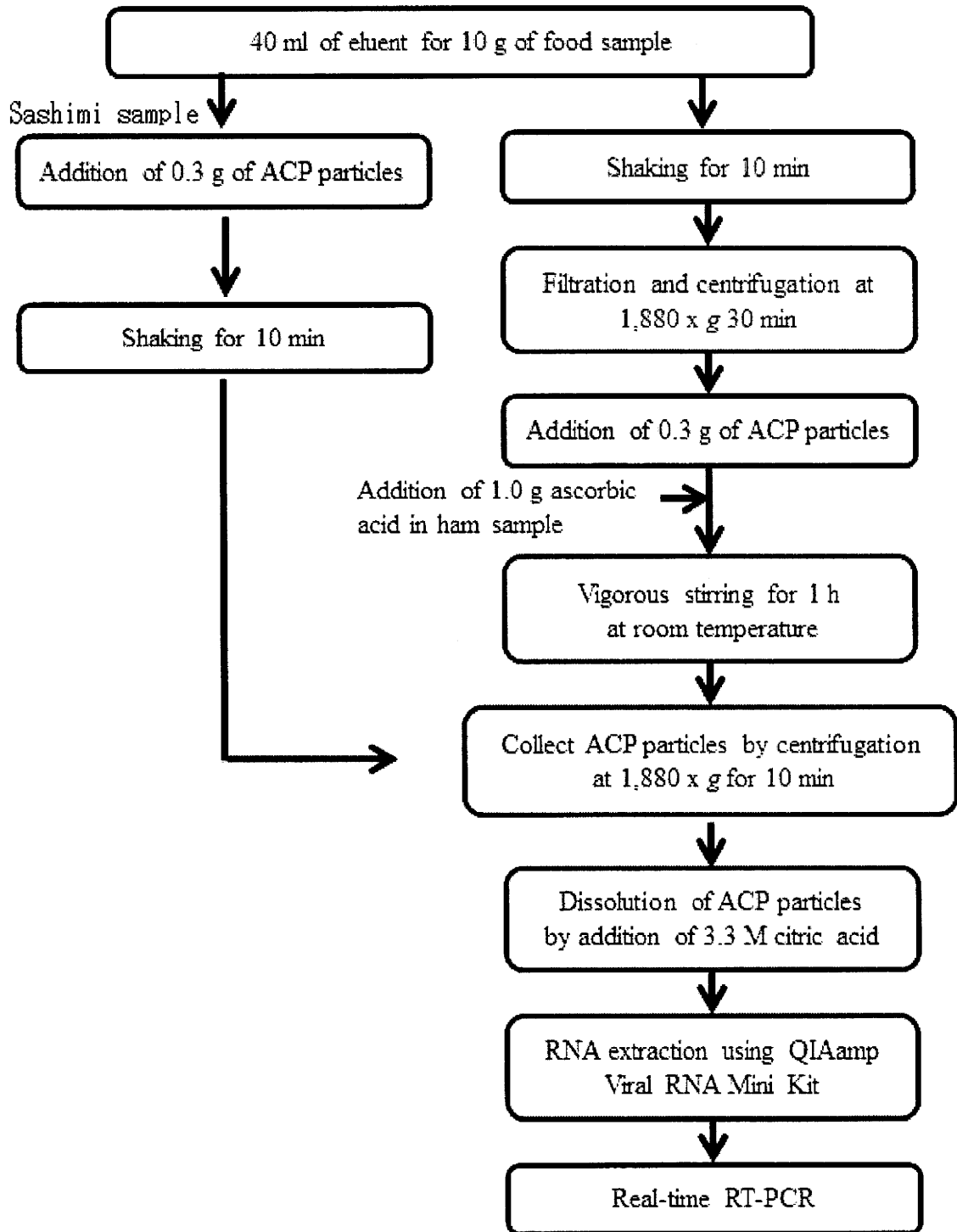


図1 食品検体からのウイルス濃縮法操作の概要

## 下痢症ウイルスの蛍光マルチプレックス RT-PCR 法による検出

研究協力者 重本 直樹 広島県立総合技術研究所・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

食中毒事例等で搬入された検体および過去の保管検体について蛍光マルチプレックス RT-PCR 法により下痢症ウイルス（ノロウイルス，サポウイルス，アストロウイルス）の検出を行った。食中毒・感染症 61 事例の原因ウイルスの検出割合はノロウイルス GI, GII がそれぞれ 10%，80% で，GI と GII 両方によるものが 7%，サポウイルスが 3%であった。食中毒 14 事例に限定すると今回はすべてノロウイルスに起因し，二枚貝が食材に含まれるケースではノロウイルス GI と GII 両方が検出された。ノロウイルス食中毒・感染症事例のうち 53 事例の遺伝子型を特定したところ，事例が発生した施設により検出遺伝子型に差異が認められた。また，蛍光マルチプレックス RT-PCR 法での検査対象外ウイルス（アイチウイルス，パレコウイルス，ポカウイルス）について，二枚貝が食材に含まれる食中毒 3 事例 10 検体を検査した結果，ノロウイルス以外に 2 事例 3 検体からアイチウイルスが検出された（遺伝子型は A 型が 2 株，B 型が 1 株）。食材に二枚貝が含まれる場合には，アイチウイルスの検査も考慮する必要があることが示唆された。

### A. 研究目的

食中毒事例等で搬入された検体および過去の保管検体について下痢症ウイルス（ノロウイルス，サポウイルス，アストロウイルス）の包括的検出を行い，ウイルスの感染実態を明らかにする。また，他の下痢症ウイルス（アイチウイルス，パレコウイルス，ポカウイルス）の関与の実態を明らかにすることを目的とした。

### B. 研究方法

#### 1. 材料

下痢症ウイルス既知検体として食中毒および感染症事例の有症者便および小児感染性胃腸炎の患者便 84 検体（ノロウイルス GI；7 検体，ノロウイルス GII；51 検体，サポウイルス；14 検体，アストロウイルス；11 検体，ノロウイルス GII とサポウイルスの重感染；1 検体）を用いた。また，過去 3 シーズンの食中毒・感染症事例として

2007年7月から2010年5月までに発生した61事例の有症者便160検体を用いた。

## 2. 方法1

10%糞便乳剤から QIAamp Viral RNA mini Kit (キアゲン) を用いて RNA 抽出を行った。蛍光マルチプレックス RT-PCR は抽出 RNA を Random primer pd(N)<sub>9</sub> (タカラバイオ) と ReverTra Ace (TOYOBO) により、30℃、10分、42℃、60分、99℃、5分の逆転写反応を行った後、これをテンプレートにしてマルチプレックス PCR を行った。マルチプレックス PCR には、Multiplex PCR Assay Kit (タカラバイオ) を使用し、プライマーには表1に示すプライマーを用いた。それぞれのプライマーセットのフォワードまたはリバースプライマーを4色のAlexa蛍光で標識した。マルチプレックス PCR 反応は94℃、60秒の熱変性の後、94℃、30秒、57℃、90秒、72℃、90秒を40サイクル行い、最後に72℃、10分の最終伸長を行った。PCR増幅産物は2%アガロースゲルで電気泳動したのち、泳動ゲルをUVトランスイルミネーター上でUV照射して蛍光バンドおよび蛍光色を確認した。

## 3. 方法2

一部の検体については Kageyama ら (J. Clin. Microbiol. 2003) のプライマーとプローブを使用し、Light Cycler480 (Roche) によりウイルスゲノムコピー数を定量した。

## 4. 方法3

二枚貝が食材に含まれる3事例の有症者便10検体については RT-PCR 法によりアイチウイルス、パレコウイルス、ボカ

ウイルスの検出も行った。検出プライマーおよび PCR 条件は表2に示すプライマーセットと既報に従った。

## 5. 方法4

検出されたノロウイルス、アイチウイルスについては PCR 産物の塩基配列を調べた。PCR産物を QIAquick PCR Purification Kit (キアゲン) により精製した後、SequiThermEXCEL II DNA Sequencing Kit-LC (EPICENTRE Biotechnologies) および LI-COR 4200 series sequencer (LI-COR) を用いたダイレクトシーケンシングにより塩基配列を決定した。ノロウイルスについては capsid 遺伝子の翻訳開始点から 264bp の塩基配列を、アイチウイルスについては 3C および 3D を含む領域 519bp の塩基配列を ClustalW プログラム (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html>) を用いて解析し、Tree explorer (<http://evolgen.biol.metro-u.ac.jp/TE/>) で系統樹を作成した。ノロウイルスの遺伝子型の分類は Kageyama ら (J. Clin. Microbiol. 2004) および病原体検出情報 (<http://idsc.nih.gov/pathogen/refer/noro-kaisetu.html>) に示された分類に従った。アイチウイルスの遺伝子型の分類は Pham ら (J. Clin. Microbiol. 2007) の方法に従った。

## (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. 結果 1

下痢症ウイルス既知の 84 検体を用い蛍光マルチプレックス RT-PCR の検証を行った結果、81 検体 (96.4%) から該当するウイルスを検出した (表 3)。電気泳動により目的の位置に標識した蛍光 (ノロウイルス GI ; 330bp 緑, ノロウイルス GII ; 344bp 赤, サポウイルス ; 430bp 黄, アストロウイルス ; 230bp 青) が目視で確認された (図 1)。不検出となった 3 検体 (ノロウイルス GI 1 検体, GII 2 検体) のウイルスコピー数を定量したところ、反応液あたり  $1.2 \times 10^2$ ,  $4.5 \times 10^2$ ,  $5.5 \times 10^3$  コピー/反応であった。

また、過去 3 シーズンの食中毒・感染症事例 (61 事例) について蛍光マルチプレックス RT-PCR 法により原因ウイルス遺伝子を検出した結果、通常の RT-PCR の結果と一致した。各ウイルス遺伝子の検出割合はノロウイルス GI, GII がそれぞれ 10% (6/61), 80% (49/61) で、GI と GII 両方によるものが 7% (4/61)、サポウイルスが 3% (2/61) であった (表 4)。アストロウイルス遺伝子は検出されなかった。食中毒 14 事例はすべてノロウイルスに起因し、二枚貝が食材に含まれるケースではノロウイルス GI と GII 両方が検出された。

## 2. 結果 2

過去 3 シーズンのノロウイルス食中毒・感染症事例のうち 53 事例の遺伝子型を明らかにした。GI で 4 遺伝子型, GII で 7 遺伝子型が認められた (表 5)。高齢者施設, 知的障害者施設では GII.4 のみが検出されたが、保育所・幼稚園, 学校など他の施設では特定の遺伝子型に偏るこ

となく検出された。特にカキが提供されたお祭り会場での事例では GI, GII とも多様な遺伝子型が検出された。

## 3. 結果 3

二枚貝が食材に含まれる食中毒 3 事例 10 検体について、アイチウイルス, パレコウイルス, ボカウイルスを検査した結果、2 事例 3 検体からアイチウイルス遺伝子を検出した (表 6)。系統樹解析の結果、遺伝子型は A 型が 2 株, B 型が 1 株であった (図 2)。パレコウイルス, ボカウイルス遺伝子は検出されなかった。

## D. 考察

ウイルス既知の 84 検体を用いて蛍光マルチプレックス RT-PCR 法の有効性を評価したところ、81 検体 (96.4%) でウイルス遺伝子が検出され、下痢症ウイルスのスクリーニング手法として利用可能であると思われる。検出されなかった 3 検体についてはゲノムコピー数をリアルタイム PCR により定量したところ、 $1.2 \times 10^2$ ,  $4.5 \times 10^2$ ,  $5.5 \times 10^3$  コピー/反応であり、蛍光マルチプレックス RT-PCR の検出限界値が  $10^2$  から  $10^3$  コピー/反応であると推察された。

また、蛍光マルチプレックス PCR 法ではそれぞれのウイルスの増幅産物がサイズ以外に蛍光色で識別できるため判定が容易なことと、ノロウイルス GI と GII のように近接する増幅バンドについても両者を区別することが可能であった。蛍光マルチプレックス RT-PCR 法では、増幅産物が近接するプライマーセットでも複数の標識蛍光を用いることにより識別が可能であることから、通常のマルチプレッ



クス RT-PCR と比べて使用できるプライマーセットの選択範囲が広がるメリットがある。

過去 3 シーズンの食中毒、感染症 61 事例へ蛍光マルチプレックス RT-PCR 法を適用したところ、通常の PCR 法と同様に原因ウイルスの特定ができ、食中毒、感染症の通常検査にも利用可能であった。今回サポウイルスは感染症事例のみからの検出であったが、サポウイルスによる食中毒事例も報告されつつあるので、今後検査数を増やして調査を継続して行う必要があると思われる。

また、ノロウイルス食中毒・感染症事例のうち 53 事例について遺伝子型を特定したところ、事例が発生した施設により検出遺伝子型に差異が認められた。特に高齢者施設ではすべて GII.4 のみが検出されており、何らかの選択圧がかかっているのかもしれない。一方、カキが提供されたお祭り会場の 3 事例ではそれ以外の遺伝子型が幅広く検出されている。今後、事例数を増やすと同時にカキ中に存在するノロウイルスの遺伝子型についても検討の余地があると思われる。

二枚貝が食材に含まれる食中毒 3 事例においてはすべてノロウイルス GI と GII が同時に検出された。さらにノロウイルス以外にもアイチウイルス遺伝子が 10 検体中 3 検体で検出され、今後の検査においてアイチウイルスも考慮に入れる必要があると思われる。検出されたウイルスの遺伝子型には遺伝子型 A および B があり、同一食中毒事例の別々の患者から遺伝子型 A および B が検出された。このことから特定の遺伝子型に偏るのではな

く普遍的に両遺伝子型が存在しているものと思われるが、今後検出事例を増やし詳細な解析を進めていく必要がある。

## E. 結論

ノロウイルス、サポウイルス、アストロウイルスのスクリーニング手法として蛍光マルチプレックス RT-PCR 法を確立した。本法では、PCR 産物のサイズ以外にプライマーに標識した 4 色の蛍光で PCR 産物を色分けし、目視により容易に検出ウイルス遺伝子を判別できる。この方法により過食中毒および感染症事例の原因ウイルスを特定することが可能であった。また、二枚貝が食材として含まれる食中毒事例ではノロウイルス遺伝子以外にアイチウイルス遺伝子も検出されることがあり、本ウイルスについても考慮する必要があることが示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

- 1) 重本直樹，福田伸治，谷澤由枝：  
2004/05-2009/10 年におけるノロウイルス集団発生事例から検出されたウイルスの遺伝子型流行状況. 第 80 回感染症学会西日本地方会学術集会，2010 年 11 月，愛媛県松山市
- 2) 谷澤由枝，桑山勝，重本直樹，山田裕，大原祥子，福田伸治：蛍光 Multiplex PCR 法を用いた食中毒起因微生物の包括的検出法. 第 31 回日本食品微生物学会学術集会，2010 年 11 月，滋賀県大津市

**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 蛍光マルチプレックスRT-PCR使用プライマー

対象ウイルス	プライマー名	方向	標識蛍光	反応液中の プライマー濃度	引用
ノロウイルスG I	G1SKF	+	Alexa488(緑)	0.4 $\mu$ M	Kojima <i>et al.</i> (2002)
	G1SKR	-		0.4 $\mu$ M	
ノロウイルスG II	G2SKF	+	Alexa594(赤)	0.4 $\mu$ M	Kojima <i>et al.</i> (2002)
	G2SKR	-		0.4 $\mu$ M	Nishida <i>et al.</i> (2007)
	G2ALSKR	-		0.2 $\mu$ M	
サポウイルス	SV-F21	+	Alexa532(黄)	0.2 $\mu$ M	Okada <i>et al.</i> (2002)
	SV-R2	-		0.2 $\mu$ M	
アストロウイルス	AC1'	+	Alexa350(青)	0.2 $\mu$ M	Sakon <i>et al.</i> (2000)
	AC230	-		0.2 $\mu$ M	

表2 アイチウイルス, ボカウイルス, パレコウイルス検出プライマー

対象ウイルス	プライマー名	方向	引用
アイチウイルス	C(+)-6261	+	Yamashita <i>et al.</i> (2000)
	C(-)-6779	-	
ボカウイルス	HBoV01.2	+	Albuquerque <i>et al.</i> (2007)
	HBoV02.2	-	
パレコウイルス	VP1-parEchoF1	+	Benschop <i>et al.</i> (2006)
	VP1-parEchoR1	-	

表3 既知検体を用いた蛍光マルチプレックスRT-PCR法の検証結果

感染 様式	ウイルス名	ゲノタイプ	検体数	検出結果 <sup>1)</sup>		
				+	(+)	-
単独	ノロウイルス	GI/1	1	1	0	0
		GI/4	3	3	0	0
		GI/8	3	2	0	1
		GII/1	1	1	0	0
		GII/3	20	17	1	2
		GII/4	19	19	0	0
		GII/5	1	1	0	0
		GII/6	4	4	0	0
		GII/8	1	1	0	0
		GII/13	1	1	0	0
		GII/14	1	1	0	0
		GII/16	1	1	0	0
		GII/UT <sup>2)</sup>	2	2	0	0
		サポウイルス	GI/1	10	10	0
GII/1	1		1	0	0	
不明	3		3	0	0	
アストロウイルス	1型	5	5	0	0	
	2型	5	5	0	0	
	7型	1	1	0	0	
複合	ノロウイルス	GII	1	1	0	0
	サポウイルス	GI/1	1	1	0	0
	計		84	80	1	3

<sup>1)</sup> 蛍光バンドの強さ: +明瞭, (+)弱い, -なし

検体番号と保有ウイルス

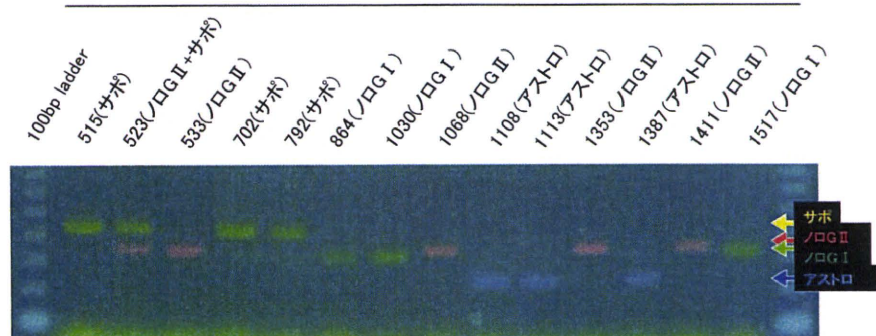


図1. 既知検体を用いた蛍光Multiplex RT-PCRの検証

増幅バンドの色と長さ: ノロウイルスG I (緑 330bp), ノロウイルスG II (赤 344bp)  
サボウイルス(黄 430bp), アストロウイルス(青 230bp)

表4 過去3シーズン(07/08~09/10シーズン)の事案における検出ウイルス

施設	事案数	検出ウイルス				
		NoV GI	NoV GII	NoV GI & GII	SaV	HAstV
高齢者施設	18		18			
保育所・幼稚園	9(1)	1(1)	8			
飲食店	8(5)	1(1)	7(4)			
学校	5	1	3		1	
仕出し・弁当店	4(2)	1	2(2)	1		
病院	4(1)	1	2(1)		1	
お祭り会場	3(3)			3(3)		
知的障害者施設	3		3			
ホテル	3(1)		3(1)			
スポーツイベント会場	2	1	1			
寄宿舍・寮	1		1			
旅行中	1		1			
計	61(13)	6(2)	49(8)	4(3)	2	0

( )は食中毒事案の件数

表5 ノロウイルス感染症・食中毒事例における施設別の検出遺伝子型

施設	Genogroup I				Genogroup II						
	GI.1	GI.2	GI.4	GI.8	GII.2	GII.3	GII.4	GII.7	GII.12	GII.13	GII.14
高齢者施設							13				
知的障害者施設							2				
飲食店				1	1		5			1	
仕出し・弁当店			1				2	1			
ホテル					1		2				
保育所・幼稚園			2		3	3	2				
学校			1	1		1				1	
病院				1	1		2				
寄宿舍・寮					1						
スポーツイベント会場				1			1				
旅行							1				
お祭り会場	1	1	1	2	2				1		1
計	1	1	5	6	9	4	30	1	2	1	1

表6 二枚貝が食材に含まれる食中毒事例でのAiV, HPeV, HBoVの検出結果

事案番号	検体番号	検体の種類	Multiplex RT-PCR				Conventional RT-PCR		
			NoV		SaV	HAstV	AiV	HPeV	HBoV
			G I	G II					
Case186	1	有症者便	-	-	-	-	-	-	-
	2	有症者便	(-)	+	-	-	-	-	-
	3	有症者便	-	+	-	-	+	-	-
	4	有症者便	+	-	-	-	-	-	-
	5	有症者便	(+)	(+)	-	-	-	-	-
Case 206	1	有症者便	-	+	-	-	-	-	-
	2	有症者便	-	+	-	-	-	-	-
	3	有症者便	+	+	-	-	-	-	-
Case215	1	有症者便	+	+	-	-	+	-	-
	2	有症者便	-	(+)	-	-	+	-	-

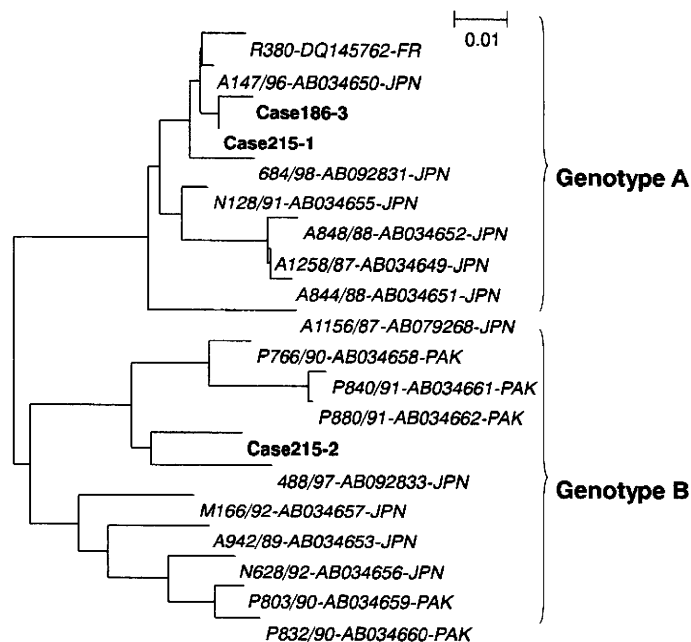


図2 アイチウイルスの系統樹解析

太字: 検出ウイルス(事例番号-検体番号), 斜字: レファレンス株

## 新たに報告されたプライマーによる 患者・食品からのサポウイルスの検出

研究協力者	飯塚 節子	島根県保健環境科学研究所
研究分担者	岡 智一郎	国立感染症研究所
研究協力者	田中 智之	堺市衛生研究所

### 研究要旨

河川水からのサポウイルス (SaV) 検出を目的に新たに設計されたプライマーを用いた nested RT-PCR をおこない、食品 (アサリ中腸腺) および患者からの SaV 検出率を従来法と比較したところ、食品からの検出率が従来法より優れることが明らかとなった。

### A. 研究目的

近年、サポウイルス (SaV) による食中毒事例が発生していることが明らかになってきた。しかし、原因食品からの SaV 検出報告は極めて稀である。

我々は、2008 年に島根県内で発生した食中毒事例について、食材のアサリから患者糞便と同様のノロウイルス (NV) およびサポウイルス (SaV) 遺伝子を検出することに成功している (Iizuka et al, J.Med.Virol.82; 2010、食品中のウイルスの制御に関する研究 平成 21 年度 総括・研究分担報告書 215-222,2010)。

最近になり、河川水からの SaV 検出に有効な新たなプライマーセットを用いる PCR 系 (新規法) が構築された (Kitajima et al, Appl. Environ. Microbiol 76: 2010)。

そこで本研究では、食中毒事例の患者糞便と原因食材と疑われたアサリを対象に、従来法 (Okada et al, Arch Virol,151: 2006) と、新規法の SaV 核酸検出率を比較検証することを主な目的とした。

### B. 研究方法

#### 1. 材料

2008 年に島根県で発生した NV と SaV を原因とする食中毒事例 A の原因食材と疑われたアサリ中腸腺 60 個 (1 パックあたり 20 個、計 3 パック) と事例 A の患者糞便 24 検体を用いた。

#### 2. 方法

##### 1) ウイルス核酸の抽出

アサリ中腸腺はアサリ 1 個の中腸腺の半量 (約 50  $\mu$ g) に 9 倍量の PBS (-) を加え 10% 乳剤を作成し、乳剤 1ml 当たり

2. 5mg の  $\alpha$ -アミラーゼ (和光純薬) を添加し、37℃、1 時間、時々攪拌しながらグリコーゲンの消化をおこなった後、12000rpm、7 分間遠心し、上清 140  $\mu$  l を Viral RNA Mini Kit (Qiagen) を用いて RNA 抽出をおこなった。

患者ふん便は 10%乳剤 100  $\mu$  l を SV total RNA Isolation System (Promega) を用いて RNA 抽出をおこなった。

## 2) DNase 処理

中腸腺から抽出した RNA は DNase 未処理、DNase I (RNase-free) (TaKaRa)、TURBO DNA-free Kit (Ambion) を用いた DNase 処理をおこなった後、それぞれ cDNA 合成をした。

## 3) nested PCR

SaV の検出はプライマーとして 1st SaV124F, SaV1F, SaV5F /SV-R13, SV-R14、2nd 1245Rfwd/ SV-R2 (新規法) と 1st SV-F13, SV-F14/ SV-R13, SV-R14、2nd SV-F22/SV-R2 (従来法) の 2 つの系をおこない、陽性数を比較した。

## (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. アサリ中腸腺からの検出状況

2 つの SaV 核酸検出系を評価した結果、検出率は DNase 処理の有無に関わらず、新規法のほうが高かった。

DNase 処理による検出率の違いは新規法、従来法とも同様の傾向であり、DNase 未処理の検出率が最も高く、次いで TURBO DNA-free Kit、DNase I (RNase-free) の

順であった (表)。

### 2. 患者糞便からの SaV 核酸の検出

いずれの検出系でも患者 24 検体中 12 検体が SaV 陽性となり、2 つの検出法の結果は完全に一致した。

## D. 考察

長らく SaV は乳幼児のみに感染性胃腸炎を引き起こすウイルスと考えられていたが、SaV 核酸検出系の導入に伴い、最近では成人を含めた SaV 食中毒事例が報告されるようになってきた。そのため、感染源、感染経路の究明を目的とした食品および環境中からの SaV 核酸検出が重要な課題となっている。

本研究で検討した新規法は河川水からの SaV 検出において従来法を含む 6 種類の single-round、nested、semi-nested RT-PCR との比較で最も検出率が高く、多様な遺伝子型が検出されたと報告されている (Kitajima et al, Appl. Environ. Microbiol 76: 2010)。

今回の検討では、糞便検体を対象にした結果、2 つの SaV 核酸検出法の検出結果は一致したが、アサリ中腸腺を対象としたところ、新たなプライマーセットを用いる新規法の方が、従来法より高い SaV 検出率を示した。そのため、食用貝などを対象とした場合、新規法の方が、より高精度に SaV 核酸を検出できる可能性がある。

また、いずれの系においても抽出 RNA の DNase I 処理によって SaV 核酸の検出率が低下したことから、食用貝などを対象とした SaV 核酸検出に関しては検体から抽出、精製した RNA に対して DNase I 処

理を行わないことが望ましい。

今後、新規法の SaV 検出率が高かった要因がより微量の SaV を検出することによるのか、より広範な塩基配列の SaV を検出することによるのかを解明するため、本研究で解析した SaV 陽性サンプルについてリアルタイム RT-PCR 法や、クローニングによる詳細な遺伝子解析を行う。

## E. 結論

新たなプライマーセットを用いる新規法は、従来法より高率にアサリ中腸腺から SaV 遺伝子を検出することができた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

(1) Iizuka S., Oka T., Tabara K., Omura T., Katayama K., Takeda N., Noda M.  
Detection of sapoviruses and noroviruses in an outbreak of gastroenteritis linked genetically to shellfish  
J. Med. Virol. 2010 Jul;82(7):1247-54.

### 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. アサリ中腸腺からのSaV検出数

	PCR系	Pack1	Pack2	Pack3
DNase未処理	従来法	10(3)	8(7)	9(5)
	新規法	16(15)	11(6)	14(11)
DNase処理(TaKaRa)	従来法	2(2)	2(1)	3(2)
	新規法	2(2)	10(10)	6(6)
DNase処理(Ambion)	従来法	NT	NT	7(4)
	新規法	NT	NT	9(5)

( ):ダイレクトシーケンスでSaVの塩基配列であることを確認した検体数

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」

協力研究報告書

## サポウイルス VLPs に対する単クローン抗体の解析とその有用性

研究協力者	北元憲利（兵庫県立大学環境人間学部）
分担研究者	岡智一郎（国立感染研・ウイルス第 II 部）
分担研究者	片山和彦（国立感染研・ウイルス第 II 部）
分担研究者	田中智之（堺市衛生研究所）

### 研究要旨：

サポウイルス(Sapovirus, SV)に対しては、遺伝子学的な検出法はあるものの免疫学的な診断法が確立されているとはいいがたい。本研究では、SV の簡便・迅速・経済的・多検体が検出可能な診断法を開発する目的で、SV-VLPs に対する MAb の作製を試みている。これまでに、いくつかの MAb を得たが、本年度はさらに新たな MAb を加えて、その解析と有用性について検討した。GI/1-、GI/5-、GII/2-、GII/3-、GIV/1-およびGV/1-VLPs を抗原とした ELISA 法およびウエスタンブロット法により各抗体の反応性を調べたところ、株特異的、G 特異的、また、すべての G に交叉する抗体が得られた。いくつかの抗体の特異性は競争 ELISA 法により確認された。すべての G に交叉する抗体 2187 の有用性について野外材料を用いてイムノクロマト法により検討したが、検出率は低く、今後、G 特異性の抗体をカクテルして使用するなどの検討が必要である。

### A：研究目的

ヒトカリシウイルスはノロウイルス属（Norovirus, NV）およびサポウイルス属（Sapovirus, SV）に分類され、両者はさらに Genogroup (G) に亜分類されている。NV 感染の診断法として、現在、免疫学および遺伝子学的診断法が利用されている。両者を比較した場合、遺伝子学的方法（PCR 法）は、感度および特異性の点で優れており、リアルタイム PCR 法などを用いれば、かなり迅速性も増してきているが、操作が煩雑で手間と技術が必要とされ、試薬も高価である。一方、免疫学的方法は、特異性や感度の点で遺伝子学的方法にはやや劣るものの、迅速、簡便で経済的にも優れ、多検

体が同時に検出できるスクリーニングなどに適している。この免疫学的手法に単クローン抗体（MAb）を利用すれば、より特異性が高くなることが期待される。

これまで、ノロウイルス様粒子(NV-VLPs)に対する MAb をいくつか作製し、ウイルスの抗原学的解析に応用するとともに、MAb の特性を生かした NV-ELISA 法やイムノクロマト法の開発を手がけてきた。

一方、SV も頻度は低いものの、感染性胃腸炎の重要な原因ウイルスとして知られており、ここ数年発症事例の報告が増えている。SV の遺伝子学的な検出法はあるものの、免疫学的な診断法が確立されているとはいいがたい。本研究で

は、SV の簡便・迅速・経済的・多検体検出可能な診断法を開発する目的で、各 G の SV-VLPs を免疫源として MAb の作製を行い、その解析と有用性について検討した。

## B：研究方法

免疫源として、バキュロウイルスで発現されたレコンビナント SV-VLPs を用いた。すなわち、GI/1 (Mc114 株) -、GI/5 (Yokote 株 = Akita 株、秋田県健康環境センター・斎藤博之先生より提供) -、GII/3 (Syd53 株) -、GIV/1 (Syd3 株) -、および GV/1 (NK24 株) -VLPs を用いた。また、抗原的解析には、ほ乳動物のベクターを用いて作製された GII/2 (Mc10) および GII/3 (C12) VLPs も新たに使用した。VLPs はいずれも国立感染研において作製された。

免疫法として、経口あるいは腹腔投与を行った。細胞融合法は常法に従って行った。抗体陽性細胞のスクリーニングは、免疫源を固相化した ELISA 法にて行った。選択された抗体産生細胞をマウスの腹腔内に接種し、得られた腹水を抗体として用いた。各 VLPs に対する交叉性は、ELISA 法およびウエスタンブロット法にて検討した。抗体の特異性は、競争 ELISA 法により確認した。競争の評価は、 $[B/B_0 = (\text{抗体} + \text{段階希釈抗原}) \text{の OD} - \text{対照の OD} / \text{抗体のみの OD} - \text{対照の OD}]$  で表した。

### (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。また、動物実験に際しては、兵庫県立大学研究倫理委員会規定に基づき、同審査委員会の承認を得て行った。

## C：研究結果

前年度までに得られた抗体に本年度得られた抗体を加えると、計 45 抗体となった。このうち、

腹水にして抗体価の高いものを選択すると、最終的に、GI/1 に対しては 5 抗体、GI/5 に対して 4 抗体、GII/3 に対して 4 抗体、GIV/1 に対して 2 抗体、および GV/1 に対して 8 抗体となった (表 1)。GI/1、GI/5、GII/3、GIV/1 および GV/1 を固相化した ELISA 法により各抗体の反応性を調べたところ、交叉反応性が異なるクローンが存在することが分かった。主な抗体の VLPs に対する反応性をまとめると表 2 のようになった。

### 1) 株特異的な MAb

各 VLPs 株に特異的な抗体、すなわち他の VLPs 株とは反応しない抗体を得た。

### 2) G 特異的な MAb

GI/5 に対する抗体および GII/3 に対する抗体の中には、G グループの株と反応する抗体があり、G 特異的と考えられた。また、同 G の中の株に対して、2 株には反応するが、他の株には反応しない抗体もあった。

### 3) すべての SV-VLPs と反応する MAb

GI/5 に対する抗体の 1 つ (MAb8127) は、すべての G の株に交叉反応性を示すことがわかった。ただし、GI および GV の VLPs に対しては強陽性であるが、GII および GIV の VLPs に対しては弱陽性であった (図 1)。ウエスタンブロット法においても同様の反応性を示した (図 2)

### 4) 競争 ELISA 法による特異性の確認

GI に特異的な MAb616 および GII に特異的な 1015、全ての G に交差する MAb8127 を用いて、それぞれの G の株に対する特異性を競争 ELISA により調べたところ、GI に特異的な MAb616 は同 G の 2 株 (Mc114 および Akita) と競合した。また、GII に特異的な MAb1015 は同 G の 2 株 (C12 および Syd53) と競合したが、他の 1 株 (Mc10) とは競合しなかった。一方、全ての G に交差する MAb8127 は GI および GV との株とは競合したが、GII および GIV の株とは弱い競合しか示さなかった (図 3)。

## 5) 野外材料との反応性

すべてのグループに反応する抗体 2187 を用いて、野外材料に対する反応性を検討した。イムノクロマト法をモデル化して検討したが、反応性は低かった。特に GII および GIV に対する検出率が低かった。

## D : 考察

元来、SV-VLPs は NV-VLPs などに比較してその産生量が悪いといわれ、それが研究の隘路となっていた。今回用いた Mc10 (GII/2) および C12 (GII/3) のように、ほ乳動物のベクターを用いて VLPs を作製することが可能になったが、依然として株により産生量が悪いものがあり、抗体および抗原の解析が進まないのが現状である。

今回得られた GII に特異的な MAb1015 は同 G の 2 株 (C12 および Syd53) と競合したが、他の 1 株 (Mc10) とは競合しなかった。同じ G の中でも MC10 は、他の C12 および Syd53 とはホモロジーがかなり異なることが知られており、変わりやすい領域を認識したものである。

また、GI に特異的な MAb616 は同 G の 2 株 (Mc114 および Akita) と競合したことから G の株の共通した領域を認識したものである。このような G に特異的な抗体を用いれば、既存のノロウイルスの診断キット (GI および GII を区別) のように G の鑑別診断に利用することも可能である。そこで、前試験として MAb616 を用いて野外材料との反応について検討したが、検出率は低かった。今後、G の異なるいくつかのクローンをカクテルにして利用するのも一案と考えられる。

一方、SV の G 間すべてに交叉反応を示す MAb8127 が得られた。ただし、株の違いにより多少反応性の強弱があり、競争 ELISA の結果に

も反映されていた。この MAbs は SV の共通領域を認識したとみられるため、野外材料を用いたイムノクロマト法によりその有用性を検討したがその検出率は低かった。

得られた多くの MAbs は株特異的であった。しかし、GIV および GV に関しては抗原として 1 株の VLP しか用いていない。同グループのいくつかの株 VLPs を用いて検討すれば、G 特異的な抗体が他にも存在する可能性がある。株特異性の抗体は、検出・診断としての利用は難しいが、抗原的解析などには役立つことが期待される。

GIV および GV 株と比較して、GI および GII 株の塩基配列多様性が大きいことが知られており、これらの株間では抗原性が異なる可能性が高いと考えられる。研究分担者の岡智一郎先生 (国立感染研) は、現在、この 2 つの G (GI および GII) に属する新たな SV 株を作出している。SV-VLP 発現系として、カイコを用いた新たな SV-VLP の発現系である。今後、これらの VLPs の数を増やし、多くの臨床材料を用いて抗体の有用性を検討する必要がある。また、得られた抗体あるいは今後新規の抗体で抗原的解析やエピトープマッピングを行うとともにサポウイルスの ELISA 法あるいはイムノクロマト法などによる検出系を構築し、流行疫学、早期発見および早期予防に寄与したい。

## E : 結論

SV の簡便・迅速・経済的・多検体が検出可能な診断法を開発する目的で、SV-VLPs に対する MAbs の作製を試み、得られた MAbs の解析とその有用性について検討した。

ELISA 法およびウエスタンブロット法により各抗体の反応性を調べたところ、株特異的、G 特異的、また、すべての G に交叉する抗体があることがわかった。また、いくつかの抗体の特異性は競争 ELISA 法により確かめられた。これ