

4. 水処理施設における流入水・放流水，河川水等の胃腸炎ウイルス汚染状況を，経時的に直接環境水を採水・濃縮して検出する方法，垂下カキを用いた検出方法，カキ中のヒト糞便由来 F 特異 RNA 大腸菌フェージの検出による間接的な測定方法が報告された。下痢症ウイルスのモニタリング成績からは上流域における感染事例を遺伝子学的に把握することが出来た。
5. E 型肝炎の流行疫学，ウイルスサーベイランスにより HEV はイノシシのみならずブタに高率な HEV 抗体が証明され，ブタ肉喫食による E 型肝炎感染に注意が喚起された。
6. ウイルス性食中毒発生原因ウイルスの一つであるサポウイルスに対して，ウイルス様粒子 (VLPs) を用いたモノクローナル抗体が作製され，その中には迅速診断法開発に有益ないくつかの抗体が含まれていた。

A. 研究目的

本研究はウイルスを介した食中毒の原因究明を解析・集約し，この研究成果を通じて食の安心・安全に寄与することを目的としている。

食中毒発生の際には最前線の現場近くで原因究明に対応し感染拡大防止について提言し保健所と共に国民の健康安全に貢献しているのが地方衛生研究所(地衛研)ある。

この班では北海道から九州に至る本邦 17 地衛研の研究協力者の協力の下，ウイルス性食中毒の発生時の迅速な検査対応，実態調査を基本とした調査研究と効率的な測定技術の開発を目的として，研究を遂行している。科学的事実に基づいた予防対策への貢献は広範囲な活動の礎となっている。特に今年度の大きな成果は，ノロウイルス食中毒事例において，原因(疑)食材からノロウイルス遺伝子を検出できる検査方法が確立されたことである。さらに，食品等からのウイルス濃縮法に様々な研究がなされた。

これまでノロウイルスによる食中毒事

例が主流と考えられていたが，他の食中毒原因ウイルスの関与も見逃せなく，関与の程度や意義が把握されつつあるとともに，迅速な検出方法も開発されてきた。

さらに環境中のノロウイルス汚染度や環境媒体のノロウイルス食中毒への関与に関する調査研究が益々重要性を増してきている。

今年度の全国地衛研 17 研究協力者の研究内容は，次のカテゴリーに大別できる。

(1): ノロウイルス関連食中毒事例の原因(疑)食材等からノロウイルス遺伝子の検出・同定法の開発について。

(2): ノロウイルス関連食中毒事例等における，ノロウイルスおよびその他の病原ウイルス(サポウイルス，アイチウイルス，アストロウイルス，アデノウイルス，A 群，C 群ロタウイルス)の関与について。

(3): ノロウイルス以外の他のウイルスが食中毒事例に関与する頻度を確認するための検査法としての Multiplex PCR 法の構築について。

(4): 下水処理施設における流入水・放流水，河川水等へのノロウイルス環境汚染

とノロウイルス胃腸炎の流行(感染)の関連性について。

(5): E 型肝炎の流行疫学と感染リスクについて。

(6): ウイルス性食中毒発生原因ウイルスの一つであるサポウイルスの迅速診断法開発について。

これらの 6 点の研究成果に焦点を合わせて総括する。

B. 研究方法

1. 研究材料

散発・集団発生に関わらず食中毒事例あるいは急性胃腸炎事例時の感染者から得られた便を中心とした臨床材料、事例に関連する食材等を用いた。動物由来材料はと畜場等で処理される際の検体を材料とした。環境材料では下水関連の環境水等を用いた。

2. 研究方法

ノロウイルス遺伝子の検出・定量・キャプシド、ポリメラーゼ領域の塩基配列の解析・系統樹作成を行い、遺伝子型別の決定、相同性を比較した(国立感染症研究所下痢症ウイルス検出マニュアル)。食材中のノロウイルス濃縮・遺伝子検出法としてパンソルビン・トラップ法、非結晶リン酸カルシウム微粒子による濃縮法、ふきとり等の清浄検体からの検出法として牛血清アルブミンと PEG を用いた水性二相分配法による遺伝子濃縮法を検討した。

環境中のノロウイルス遺伝子検索は、検体を直接に濃縮する方法、カキ中のヒト糞便由来 F 特異 RNA 大腸菌ファージを検出する方法や垂下カキ、岩ガキ等から

遺伝子を検出する方法がなされた。サポウイルス迅速診断法の開発にはサポウイルス中空粒子(VLPs)を用いて作成されたモノクローナル抗体を用いた。(この項の研究方法については各研究協力者の報告を参照されることが望まれる)。

(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、実験動物を用いる際には、当該施設での倫理基準に準じて対処した。

C. 研究結果

1. ノロウイルス関連食中毒事例の原因(疑)食材等からノロウイルス遺伝子の検出・同定法の開発

本班の一つの重要な研究テーマはノロウイルス関連食中毒事例の原因(疑)食材からノロウイルス遺伝子の検出である。開発中であったパンソルビン・トラップ法によるノロウイルス遺伝子検索の結果、一つの事例から、食品保存検体からノロウイルス遺伝子が検出され、因果関係が同定された(田中, 斎藤研究分担報告書)。食材中のウイルス濃縮法として、非結晶リン酸カルシウム微粒子を用いたウイルス濃縮法ではネコカリシウイルスの添加・回収実験を試みた。その結果、10%以下を低い回収率、11%以上を回収率が良いものとした評価基準に従って解析すると、食材によって回収率に差があることが判明した。回収率が高いものは野菜 88%, 穀物 50%, 食肉・魚肉 83%などで、回収率が低いものは小豆あん、卵の花、

白和え等で2%以下であった。食材により回収率の異なる成績は重要な知見である(篠原)。一方、環境等の表面に付着しているノロウイルスの検出を目的にした牛血清アルブミンとPEGを用いた水性二相分配法の添加回収実験では、37%~85%の回収率であった。ふきとり検査等に有望な方法と考える(田村)。

2. ノロウイルス関連食中毒事例等における各種胃腸炎ウイルスの関与
ウイルス性胃腸炎の起因ウイルスはノロウイルスの頻度が最も高い。その他の胃腸炎ウイルスの関与をみると、サポウイルス、ロタウイルス、アストロウイルス、アイチウイルス、アデノウイルス等がある。ノロウイルスの関与は、ウイルス検出胃腸炎事例269事例のうち256例(95.2%)の報告(森)、189検体中124検体(65.6%)の報告(小林)、156例中73例(47%)に関与している(山下)報告である。集団感染事例では11例中10例(90.9%)がノロウイルス単独、一例がサポウイルスとの混合感染の報告(名古屋)、さらに二枚貝関連食中毒事例と非関連事例に分けてみると、前者では100%、後者では83.3%にノロウイルスが関与していた(吉澄)。また二枚貝非関連食中毒疑い事例では90%がノロウイルス関連であった(吉澄)。このように食中毒事例におけるノロウイルスは非常に高い頻度に関与していることが分かった。

一方、二枚貝(カキ等)関連事例ではノロウイルス以外にも上述のさまざまなウイルスが単独にあるいは混合感染の形での関与が認められているのが特徴である(入谷、吉澄)。しかし、ウイルスの種類、

関与の頻度は地衛研によってさまざまであるが、成人の集団胃腸炎でA群ロタウイルス感染に警鐘する報告もある(吉澄)。この中でノロウイルスに注目すると、GII.3の台頭(小林)、GII.3キメラウイルスの検出(名古屋、山下)の報告がある。

3. 各種胃腸炎ウイルスの食中毒事例への関与を確認するための検査法としてのMultiplex PCR法の構築
蛍光RTマルチプレックスPCR法は反応産物における標識蛍光色素の目視による検出法である。昨年度に比べ、反応時間の短縮(1.5時間)、さらにアイチウイルス、ボカウイルス、パレコウイルスの検出系まで発展させた(重本)。一方マルチプレックスreal-time PCR法では、アニーリング温度、プライマー・プローブの濃度設定の改良により検出感度の向上が見られた。この方法ではノロウイルスの他に、サポウイルス、アストロウイルス、A群およびC群ロタウイルス、腸管アデノウイルス、エンテロウイルスの検出が可能となった(小和田)。

4. 下水等におけるノロウイルス環境汚染とノロウイルス胃腸炎の流行の関連性

下水処理施設における流入水、放流水、河川水についてノロウイルス汚染状況を調査した(三上、高橋、名古屋、内野、阿部)。検出方法は直接に採水材料から遺伝子を濃縮・検出する方法と(三上、高橋、名古屋、内野)と間接媒体を用いる方法(高橋、阿部)に分かれる。検出されたウイルス遺伝子はノロウイルスのみならず、サポウイルス、アストロウイルス、エンテロウイルス、アイチウイルス、アデノ

ウイルス, A 群ロタウイルスが検出された。これらのウイルス遺伝子は流入水に多く検出されたが, 流入水で検出された遺伝子が放流水では検出されないウイルス遺伝子も存在した(高橋)。上流地域での胃腸炎流行ウイルスと環境からの検出遺伝子はおおむね一致しているが, アストロウイルス, アイチウイルスは環境検体のみから検出された報告もある(内野)。季節的な検出頻度では, 流行期に一致しているが(高橋), アイチウイルスは通年的に検出された報告もある(内野)。間接的な検出法である垂下カキでは上流域での流行状況を把握できるという報告がある(高橋)一方, F フェージを用いた検出法では, 検出感度が real-time PCR 法に比べ低く, 課題を残した(阿部)。しかし, 生きたノロウイルスの存在推定が可能で, 有意義な検出法と思われる。

二枚貝, 特にカキは感染リスクの高い食材であるが, 生食の機会の多い岩カキからのノロウイルス遺伝子の検出(名古屋)は注目に値する。また, 昨年度まで市販カキパック水中から検出されたノロウイルスは今回の報告では検出されなかった。リスクがゼロになったことを意味するものでは決してない。アサリからサポウイルスが検出されたが, 検出方法の改善により高率にしかも異なる遺伝子型をもつサポウイルスが検出された(飯塚)。A 型肝炎ウイルス遺伝子は検出されていない(入谷, 三上, 高橋)。

5. E 型肝炎の流行疫学と感染リスク

E 型肝炎ウイルスの浸淫状況では, 野生イノシシでは 9.2%の感染率で, ほぼ昨年と同頻度であった。一方豚では, 血清中

からの検出率は 0.09%であったが, 廃用肝臓の 6%から検出された。さらに血清中 IgG 抗体は 72%と高頻度に見られた。この成績は, 豚は HEV 感染リスクが高いことを示す結果である(原田)。

6. サポウイルスの迅速診断法開発

サポウイルス VLPs の作製とそれに対するモノクローナル抗体の作製を試みた。サポウイルス 4 Genogroups 全てに対し, 今範囲に交差反応する 3 クローン(IgG1 3, IgM 1)が作製された。今後, 遺伝子検査に依存しているサポウイルス診断検査が迅速に検査・対応できるイムノクロマト法の構築に貢献が出来る可能性が高まった。

D. 今後の課題と展望

① 食材等からの食中毒原因ウイルス検出方法としてパンソルビン・トラップ法, 非結晶リン酸カルシウム微粒子を用いたウイルス濃縮法, 牛血清アルブミンと PEG を用いた水性二相分配法が検証されている。前 2 者は昨年度からの継続研究で成果が着実に見られている。後 2 者は, 今後実際例の食材等を用いた検出成果が検証されるべきである。どの方法においても検出された遺伝子が, 患者検体からの遺伝子との塩基配列の相同性の確認が重要で, 今後の大きな研究課題と考える。

② 感染事例の患者検体から複数のウイルス遺伝子が検出されていることから, 混合検出の意義を詳細に解析する必要があると考える。つまり, ウイルスの感染性の優劣, 病原性へ

の影響等である。昨年度の報告(吉澄, 北海道立衛生研究所)ではノロウイルス, サポウイルス感染性の優劣について言及しているが, その他のウイルスについても同様の考察が必要であろう。この解析は地方衛生研究所のみしか出来ない研究と考え, 大きな成果の期待が出来る。

- ③ Multiplex PCR法は, 上記②の複数のウイルス遺伝子検出には欠かせないツールと考える。検出方法の普及が望まれる。
- ④ 環境中水における食中毒原因ウイルスを検出し, 感染症発生状況をモニタリングすることは意義あることと考える。しかし, 環境水であるがゆえにタイムラグは避けられず, リ

アルタイムな結果ではなく, レトロスペクティブな成果としてのみ還元されている。このタイムラグを縮め, プロスペクティブに, 感染症予防情報を発信出来るような工夫が必要ではないかと考える。

- ⑤ 食品を介する E 型肝炎では, これまでイノシシがハイリスク対象動物として注意喚起されていたが, 今年度の報告では, むしろ豚の高率な汚染が報告された。肉料理に伴う交差感染など偶蹄目に属する動物の感染予防の啓発をさらに行うことが重要である。
- ⑥ モノクローナル抗体を用いたサポウイルス迅速診断法の実用化が望まれる。

平成 23 年度厚生労働科学研究費補助金(食品の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

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 —種々の食品への応用—

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、岸本剛（埼玉県衛生研究所）

研究要旨

非晶性リン酸カルシウム (ACP) 微粒子を用いた食品からのウイルス検出法の開発を目的として、昨年度は、レタス、キャベツ、まぐろの刺身、白飯、ハムを対象に、ACP 微粒子濃縮法によるウイルス添加回収実験を行ったところ、いずれの食品からも効率良くウイルスを回収できることが判明した。今年度は、対象食品を拡大し、ポテトサラダ、中華風きゅうりの和え物、冷凍ラズベリー、ゆでうどん、ミートソーススパゲティ、ソース焼きそば、つくね、肉団子の甘酢あん、ひじきの煮物等 24 種類の食品について、添加したネコカリシウイルス (FCV) の回収率を調べた。その結果、野菜類では冷凍ラズベリーを除き 16-73%と効率良くウイルスが回収された。しかし、穀物類では 1-33%、食肉・魚肉類では 7-45%で、一部の食品で低い回収率であった。回収率の低かった食品のうち、油脂含有食品のミートソーススパゲティに注目し操作の改良を検討した結果、ミートソーススパゲティではイソアミルアルコール処理を追加することにより、回収率が大幅に改善した。

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。しかし、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等を阻害することなどから、食品中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。食中毒事例における感染経路の特定や原因究明のため水や食品中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。食品中からのウイルス検出を行うために、様々な方法が開発されているが、時間と労力を要するものが多く、より簡便で効率の良い方法の開発が望まれている。

る。そこで、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回収法として、非晶性リン酸カルシウム微粒子（ACP 微粒子）を用いた方法の検討を行った。今年度は、昨年度構築した ACP 微粒子濃縮法を種々の食品に応用し、一部の食品における操作の改良を目的とした。

B. 研究方法

1. 供試食品

添加回収実験には、コンビニエンスストアで販売されていた弁当類、サラダ類、生菓子、冷凍果実を用いた。具体的には幕の内弁当のおかず（つぼ漬、中華風きゅうりの和え物、フライドポテト、うずら豆煮物、焼鮭、皮なしウインナー、つくね、肉団子の甘酢あん、ひじき煮物、卵の花、白和え）、サンドイッチ材料（ロールパン、タマゴフィリング、ツナフィリング、ハムカツ）、ミートソーススパゲティ、ゆでうどん、ソース焼きそば、サラダ類（ポテトサラダ、ハルサメサラダ、マカロニサラダ）、菓子類（小豆あん、シュークリーム）、冷凍ラズベリーを検討の対象とした。食品サンプルは 10 g ずつに小分けし、 -20°C に保管した。

2. 添加ウイルス

昨年度と同様に、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。

3. 食品検体の人工的ウイルス汚染方法

食品検体 10 g に FCV 1.8×10^4 - 1.8×10^5 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検体をストマッカーバッグに移し、食品洗浄液 40 ml を添加して 10 分間振とうした。食品洗浄液には基本的には PBS (-) を用い、一部の食品において Tris-glycine 液 (pH 9.5) (100 mM Tris、50 mM glycine)、pH3 に調整した蒸留水の使用を検討した。テトロンメッシュ (100 メッシュ) でろ過後、ろ液を $1880 \times g$ 、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。1,880 $\times g$ 、10 分遠心後、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。

油脂含有食品 (ミートソーススパゲティ) については、食品洗浄液に PBS (-) または Tris-glycine 液 35ml を用いた。ろ過後の液にイソアミルアルコール 10ml を添加して転倒混和した。遠心後、イソアミルアルコール層を除去した液に ACP 粒子を添加し、前述のとおり操作した。

5. ウイルス RNA の抽出方法

ACP 粒子溶解液 140 μl 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 Diethylpirocarbonate 処理水 60 μl を用いた。

6. 逆転写反応

逆転写反応 (30 μl) は抽出 RNA 15 μl を用いて昨年度と同様に実施した。

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。検量線は、FCV F9株の塩基配列の4,462-4,548塩基(DDBJ accession number M86379)を合成し、10倍段階希釈(10^0 - 10^7 コピー/ μ l)したものを用いて作成した。

8. 回収率の評価

回収率の区分は、1-5%：低回収率、6-10%：中等度の回収率、11-20%：高回収率を参考にし(J. Virol. Methods, 169, 22-27, 2010)、10%以下を低い回収率、11%以上を回収率が良いものとした評価基準を設定した。

(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. 種々の食品への ACP 微粒子濃縮法の応用結果

種々の食品からのウイルス回収結果を、野菜、穀物、食肉および魚肉、その他の4つの食品群に分類して表1に示した。表中には昨年度検討したキャベツ、レタス、ハム、マグロの刺身、白飯に関する結果も再掲した。PBS(-)で洗浄した場合には、野菜群では冷凍ラズベリーにおけるウイルス回収率が1%と最も低く、他の食品は16-73%の回収率であった。穀物群では、ミートソーススパゲティ、フライドポテト、マカロニサラダからの回収率が1-7%と低かったのに対し、ソース焼きそば、ゆでうどんからは約30%が回収され、白飯からは14%が回収された。食肉および魚肉群からは焼鮭を除き効率的にウイルスが回収された。その他の食品群

はすべて2%以下で、ほとんどウイルスが回収できなかった。

回収率の低かったフライドポテト、ミートソーススパゲティ、卵の花、タマゴフィリングについて洗浄液の種類を変えて濃縮を行ったが、いずれの食品でも回収率の大きな改善はみられなかった。

2. 油脂含有食品(ミートソーススパゲティ)処理方法の検討結果

油脂を多く含む食品のひとつとして、ミートソーススパゲティに注目し、処理方法を検討した。油脂を除去する目的でイソアミルアルコール処理を追加実施した結果を表2に示した。イソアミルアルコールを用いない場合には、洗浄液を変えてもほとんどウイルスは回収されなかった。一方、最初の遠心の前にイソアミルアルコールを添加し、軽く転倒混和する過程を追加したところ、洗浄液にPBS(-)を用いた場合では 10^5 コピー添加時65%、 10^4 コピー添加時28%、Tris-glycine液を用いた場合には 10^5 コピー添加時98%、 10^4 コピー添加時80%となり、ウイルス回収率は大幅に改善した。

D. 考察

ACP 微粒子濃縮法で種々の食品からのウイルス検出を行ったところ、中華風きゅうりの和え物(73%)、ソース焼きそば(33%)、ゆでうどん(29%)、肉団子の甘酢あん(25%)などの回収率が得られた食品と、ひじきの煮物、卵の花、小豆あん、タマゴフィリングなどほとんど回収ができなかった食品が存在した。回収率が10%を超えるか否かを指標として、回収結果を食品群別にみると、野菜群では冷凍ラ

ズベリー以外は効率良くウイルスが回収された。冷凍ラズベリーは食品の性状が複雑で表面からウイルスを誘出しにくいこと、また解凍して溶出する酸とペクチンが、ウイルス誘出、濃縮及び酵素反応を阻害することなどの理由で、ウイルス回収の困難な食品と考えられている。冷凍ラズベリーをはじめとする果実類からの検出法については、今後の検討課題としたい。穀物群では白飯(H22年度実施分)、ゆでうどん、ソース焼きそばでは効率良くウイルスが回収されたが、フライドポテト、ミートソーススパゲティでは低い回収率であった。またロールパンからの回収率も9%であり、回収効率は低かった。このうちパンは洗浄時に洗浄液をほとんど吸ってしまい、十分に洗浄液が回収できなかったことが影響していると推測された。食肉及び魚肉類では焼鮭以外は効率良くウイルスが回収された。その他の食品群では本法ではほとんどウイルスが回収できなかった。この群に分類した食品はハムカツを除き、洗浄液を加えて振とうすると食品が溶液全体に分散し、ろ過ができず、また、遠心操作を行っても食品残渣と洗浄液を分離することができない食品であった。このような食品ではACP微粒子とウイルスを接触させること及びACP微粒子の分離が困難であると考えられる。また、卵の花や白和えは大豆製品であることから、酸性ポリサッカライドを多く含有しており、これが酵素反応を阻害し、ウイルス遺伝子の検出を阻害している可能性も考えられる。また、ハムカツでは、衣が洗浄液を吸ってしまい、溶液の回収が十分にできないことと、食

品に含まれる油脂分が濃縮を阻害していることが低回収率の原因ではないかと推測される。このような食品の処理方法についても今後さらなる検討が必要である。さらに、ひじきの煮物については、別途洗浄後の液にFCVを多量に添加し、その液から直接RNA抽出し、逆転写反応、リアルタイムPCRを実施しても、全く遺伝子が検出されないという結果を得ている。ひじきから溶出される何らかの物質が逆転写反応以降を強く阻害している可能性が浮上した。他の海藻類についても同様なのか、今後検証する必要がある。

油脂を多く含み回収率の低かった食品のひとつとしてミートソーススパゲティを取り上げ、処理方法を検討したところ、イソアミルアルコールによる簡単な処理で、回収率を改善することができた。この方法が他の食品にも応用可能かさらに検討を重ねたいと考える。

E. 結論

ACP微粒子法を種々の食品からのウイルス検出に応用し、FCVを用いた添加回収実験を行った。野菜類では、冷凍ラズベリーを除き、16-73%と効率良くウイルスが回収された。穀物類では1-33%、食肉・魚介類では7-45%の回収率であり、フライドポテトや焼鮭など一部の食品で回収率が低かった。また、ミートソーススパゲティ、小豆あん、シュークリームなどではウイルス回収が困難であった。

ウイルス回収が困難な食品のうち、油脂含有食品について処理方法の改良を検討した。ミートソーススパゲティではイソアミルアルコール処理をすることによ

り回収効率が改善された。

今後も低回収率の食品における処理方法の改良を継続する予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

篠原美千代、富岡恭子、峯岸俊貴、鈴木典子、内田和江、島田慎一、河橋幸恵、岸本剛、吉川悠子、大橋典男、野田衛：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検出法、第32回日本食品微生物学会学術集会、2011年10月、東京

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 ACP 微粒子濃縮法による種々の食品からのウイルス回収状況

食品群	ウイルス回収率（洗浄液：PBS(-)）		
	5%以下	6-10%	11%以上
野菜	冷凍ラズベリー (1)		千切りキャベツ (32) ^a カットレタス (50) ^a ポテトサラダ (16) ハルサメサラダ (17) 中華風きゅうりの和え物 (73) つぼ漬 (17)
穀物	ミートソースパゲティ (1) フライドポテト (4)	ロールパン (9) マカロニサラダ (7)	白飯 (14) ^a ゆでうどん (29) ソース焼きそば (33) うずら豆の煮物 (11)
食肉・魚肉		焼鮭 (7)	スライスハム (45) ^{ab} 皮なしウインナー (16) つくね (19) 肉団子の甘酢あん (25) マグロ刺身 (52) ^{ac}
その他	小豆あん (<1) シュークリーム (<1) ひじきの煮物 (0) 卵の花 (0) 白和え (0) タマゴフィリング (<1) ツナフィリング (2) ハムカツ (<1)		

() 内の数値は平均回収率を示す

a 平成 22 年度実施分

b アスコルビン酸を添加

c 洗浄液に pH3 に調整した蒸留水を用い、ACP 微粒子とともに振とうした

表2 ミートソーススパゲティからの処理方法別ウイルス回収状況

FCV 添加量 (コピー)	洗浄液	イソアミル アルコール処理	FCV 回収率
$4.5 \times 10^4 - 7.5 \times 10^4$	PBS(-)	なし	1%
$4.5 \times 10^4 - 7.5 \times 10^4$	pH3 DW	なし	6%
7.5×10^4	Tris-glycine	なし	3%
1.8×10^5	PBS(-)	有	65%
1.8×10^4	PBS(-)	有	28%
1.8×10^5	Tris-glycine	有	98%
1.8×10^4	Tris-glycine	有	80%

平成 23 年度厚生労働科学研究費補助金(食品の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

牛血清アルブミンとポリエチレングリコールを使用した 水性二相分配法によるノロウイルスの濃縮法の検討

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

ノロウイルスによる手指汚染が食品の表面汚染につながり、食中毒が発生する事例が多いことから、食品、手指や環境等の表面のノロウイルス汚染のリスク評価のため、比較的清浄な検体からのノロウイルスの検出法を検討した。牛血清アルブミン、ポリエチレングリコール 6000、及び NaCl を使用した水性二相分配法により、ノロウイルスは BSA 層に濃縮でき、BSA 層から核酸抽出して、リアルタイム RT-PCR 法により検出することができた。本法による、PBS(-)へのノロウイルスの添加回収試験では、37%~85%の回収率を得ることができた。ふきとり検査検体等からのノロウイルス検出法に利用できると思われる。

A. 研究目的

ノロウイルスによる手指汚染が、食品の表面汚染につながり、食中毒を起こす頻度はきわめて高く、多くの事例報告がされている。そこで、手指、食品、調理環境の表面等のノロウイルス汚染のリスク評価のため、比較的清浄な検体からのノロウイルスの検出法を検討した。平成 15 年 11 月 5 日付け食安監発第 1105001 号厚生労働省医薬品食品局食品全部監視安全課長通知(通知法)で示されているポリエチレングリコール 6000 (PEG)を用いた沈殿法では、比較的清浄な検体からはウイルス遺伝子の検出効率の低下が起こること

がある。そこで、タンパク質やウイルスの濃縮法として使用されている水性二相分配法(Hatti-Kaulら: Molecular biotechnology. 19, 2001)を利用して、ノロウイルスの濃縮法を検討した。

B. 研究方法

水性二相分配を起こす物質として、PEG、NaCl 及び牛血清アルブミン (BSA) を使用し、タンパク質粒子であるノロウイルスを BSA 層に濃縮する方法について検討した。二相分配を起こす条件を設定後、本法を用いてノロウイルスの添加回収試験を実施した。

(1) PEG 濃度の検討

PBS(-)に結晶 BSA (Albumin from bovine

serum, A3659-100G, Sigma) を 3% 添加して、45°C のウォーターバスで加温溶解後、NaCl を 1M 添加して溶解した。PEG を 8% と 12% の 2 条件として同様に加温溶解し混和後、冷蔵庫で一晩静置して二相分配の有無を観察した。

(2) NaCl の濃度の検討

8ml の PBS(-) に、BSA 濃度を 3%、PEG を 12% とし、NaCl を 0.5% から 2% の 7 段階の条件で (1) と同様に加温溶解して冷蔵庫で一晩静置し、二相分配後の BSA 層を回収してその重量を測定した。

(3) BSA の濃度の検討

検体となる PBS(-) の量を、食品検体を想定した 35ml、環境ふきとり検体を想定した 8ml の 2 つの容量設定とした。35ml 系では BSA を 0.5% から 3% の 6 段階の条件で、8ml 系では 1% から 3% の 3 段階の条件で溶解し、それぞれの管に PEG を 12%、NaCl を 1M の濃度で加温溶解して一晩静置し、二相分配の有無を観察した。

(4) BSA-PEG 水性二相分配法による添加回収試験—PEG 沈殿法との比較—

添加用のノロウイルスは、GII.4 ノロウイルスが陽性となった便から、BSA 沈殿法と超遠心法により濃縮・精製して、約 1.7×10^6 個/100 μ l の濃度としてストックし、これを約 10^4 個～ 10^5 個/100 μ l に希釈して添加用ノロウイルス液とした。

ノロウイルスの添加回収試験を、BSA-PEG 水性二相分配法と PEG 沈殿法 (PEG 濃度 12%、NaCl 濃度 1M) について実施し、比較した。35ml 系では、PBS(-) 35ml に、BSA を 1.75%、8ml 系では PBS(-) 8ml に 3% 添加し、PEG を 12%、NaCl を 1M の条件で実施した。これらの濃縮工

程を図 3 に示す。調整した濃縮サンプルを核酸抽出検体として、QIA viral RNA mini kit (QIAGEN) で抽出した。検体の PBS(-) が 8ml 系の場合は、抽出用原液を 140 μ l に調整し、QIA cube (QIAGEN) 用いてウイルス RNA を抽出した。抽出 RNA を TURBO DNA-free kit (Applied Biosystems) により DNase 処理後、High Capacity RNA-to-cDNA kit (Applied Biosystems) により逆転写し、通知法と同様にリアルタイム PCR 法で定量した。

(5) 静置時間による添加回収率の変動

BSA、NaCl、PEG を溶解後、一晩静置することで、自然に二相分配による BSA 層を形成させたが、これらの溶媒を溶解するとミセル状に混濁することから、既に粒子状の分配が起こっていると考えられた。そこで、PEG 及び NaCl を溶解後、静置時間による差を検討するため、1 時間後と 15 時間後に遠心して BSA 層を分離し、ノロウイルスの添加回収試験を実施して比較した。

(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) PEG の濃度の検討

ノロウイルスの検査法の通知法で使用される、PEG の濃度 8% では、二相分配は起こらず、12% の条件で二相分配が起こった (図 1)。

(2) NaCl の濃度の検討

NaCl 無しでは二相分配は起こらず、0.75M まで上昇させると、濃度勾配に従って回収される BSA 量が増加した (図 2)。

更に NaCl の濃度を上げると、回収される BSA 量は減少し、0.75M で 0.118g 回収できた BSA が 2M の濃度では 0.018g まで低下した。PEG12% の条件では、0.5M から 1M の間の濃度が、BSA の回収率が高かった。

(3) BSA の濃度の検討 (表 1)

検体となる PBS 量が 8ml では、BSA 濃度 1% で二相分配は起こらず、2% 及び 3% で二相分配が起こり、回収できた BSA の量は、2% で $20\mu\text{l}$ 、3% で $85\mu\text{l}$ と 3% のほうが多かった。検体 PBS 量 35ml では、BSA 濃度 0.5%、1% では二相分配が起こらず、1.5% から 3% で二相分配が起こったが、1.5% 濃度では、回収 BSA 量が少なく、二相分配の形成が不安定であった。BSA 濃度 1.75% では $60\mu\text{l}$ の BSA が回収でき、2%、3% となるにつれて回収量は増加した。

(4) BSA-PEG 水性二相分配法による添加回収試験—沈殿法との比較— (表 2)

二相分配で回収できた BSA を直接核酸抽出キットの溶解液に溶解すると、タンパク濃度が高すぎて固化することがある。そこで、回収できた BSA 層を 2 倍程度に希釈することとした。(1) から (3) の予備試験の結果から、二相分配が起こり、BSA がある程度の量回収でき、かつ $140\mu\text{l}$ の量に希釈できる条件として、8ml 系での添加回収試験の条件を、BSA 濃度 3%、PEG 濃度 12%、NaCl 濃度 1M の条件とした。35ml 系では、BSA 濃度を 1.75% とし、PEG、NaCl の濃度は 8ml 系と同じ条件とした。

これらの条件で、約 1.7×10^4 個のノロウイルスの添加回収試験を実施し、添加試料からの直接抽出サンプルと比較したところ、8ml 系では 53%、35ml 系では 37% の回収率が得られた。なお、沈殿法では、

8ml 系、35ml 系それぞれ 12%、19% となり、BSA-PEG 法のほうが、回収率が高い結果となった。

また、35ml 系で BSA の濃度を 1.75% と 2% で比較した場合、BSA 濃度 1.75% に比べ 2% のほうが、回収率が低くなった。

(5) 静置時間による添加回収率の変動 (表 3)

静置時間 1 時間と 15 時間の BSA の回収量はそれぞれ、75mg、99mg となり、時間が長いと BSA の回収量は多くなった。ノロウイルスの添加回収試験では、15 時間後が 45% となったのに対し、1 時間後は 85% と BSA の回収量とは逆にノロウイルスの回収率が高くなった。

D. 考察

水性二相分配法によるウイルスの濃縮は、通常 PEG とデキストランの系で行われている。ウイルスはデキストランに移行し、デキストランを除去して、ウイルスを回収する方法が常用されている (七条 : Tropical Medicine. 18 : 1976、Grindrod ら : Archiv fur die gesamte Virusforschung. 31, 1970)。今回は、タンパク質の濃縮法を応用し、BSA 層にノロウイルスを濃縮し、BSA 層から直接核酸抽出キットにより、核酸を抽出することができた。

また、PBS(-) に添加されたノロウイルスの濃縮法として、BSA と PEG による水性二相分配法が、PEG による沈殿法より、ノロウイルスの回収率が向上することがわかった。

PEG、NaCl 溶解後、15 時間の静置時間を 1 時間に短縮しても高い回収率が得ら

れた。この際、15 時間静置よりも 1 時間の静置のほうが、BSA の回収量が少なかったことから、回収できた BSA のタンパク量が多すぎて、核酸抽出効率が低下しているものと推測された。また、35ml 系のノロウイルスの添加回収試験では、BSA 濃度 2%より 1.75%のほうが、回収率が高くなったことも、抽出効率の低下によるものと考えられた。このことから、静置時間は 1 時間でも十分であること、抽出キットの溶解液を多くして、抽出効率を上げることが必要であると思われた。

ノロウイルスの濃縮法には様々な方法が検討されているが、BSA はウイルスの培養を行っている施設では常用されている試薬でもあり、器具や施設のふきとり検体などの比較的清浄な検体の不意の検査依頼があった際にこの方法は有意に活用できると思われる。

E. 結論

牛血清アルブミン (BSA)、ポリエチレングリコール 6000、及び NaCl を使用した水性二相分配法により、PBS (-) に添加したノロウイルスを BSA 層に濃縮することができた。本法を使用した、8ml 又は 35ml の PBS (-) への $10^4 \sim 10^5$ 個の添加

回収試験により、37%から 85%の回収率が得られた。

F. 研究発表

1. 論文発表

無し

2. 学会発表

田村務、渡邊香奈子、田澤崇、渡部香、昆美也子、野田衛：牛血清アルブミンとポリエチレングリコールを使用した二相分配法によるノロウイルスの濃縮、第 32 回日本食品微生物学会学術総会、2011 年 10 月、東京

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



図 1 PEG 濃度による二相分配の違い
左は PEG8%、右は PEG12%で、
右の管底に BSA 層が確認できる。

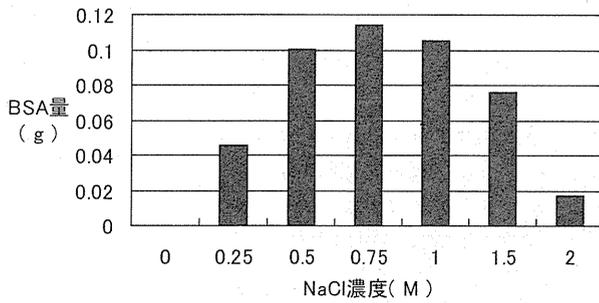


図2 NaClの濃度によるBSAの回収量の比較

※PEG : 12%、BSA : 3%、PBS(-) : 8ml

表1 BSAの濃度によるBSAの回収量

PBS(-)検体量	8ml	35ml
BSA濃度(%)	BSAの回収量(μl)	BSAの回収量(μl)
0.50	—	0
1.00	0	0
1.50	—	微量
1.75	—	60
2.00	20	100
3.00	85	420

※PEG : 12%、NaCl : 1M

BSA-PEG 二相分配法

8mlまたは35mlのPBS(-)の入った遠心管に、ノロウイルスを添加する。

↓

結晶BSAを所定の濃度に添加後、45°CのWBで加温溶解する。
(8ml系3%、35ml系1.75%)

↓

PEG12%、NaCl 1Mを入れ加温溶解後、冷蔵で1晩静置

↓

10000rpm(9800g) 30min遠心し、上層をできるだけ除去。下層のBSA層を1.5mlマイクロチューブにとる。

↓

更に14000rpm(17,000g)、5min遠心し、PEG層を完全に除去する。

↓

60~100μlとなるので、PBSで希釈し、約140μlとする。

BSA 沈殿法

8mlまたは35mlのPBS(-)の入った遠心管に、ノロウイルスを添加する。

↓

PEG12%、NaCl 1Mを入れ加温溶解後、冷蔵で1晩静置

↓

10000rpm(9800g) 30min遠心し、上層を除去。更にペーパータオルに伏せて、PEGを除去する。

↓

PBSを100μl入れ、管底とその周囲を洗い、PBSを1.5mlマイクロチューブに回収する。更に50μlのPBSで管底を洗い、回収する。約140μlとなる。

図3 添加回収試験におけるノロウイルス濃縮工程

表2 ノロウイルス添加回収試験結果

PBS(-):8ml				結 果			
方法	BSA濃度	PEG濃度	繰り返し数	実測値平均 (コピー数)	SD	CV	Recovery (%)
BSA-PEG	3%	12%	5	379	140	0.37	53
PEG沈殿法	—	12%	5	85	36	0.42	12
添加試料			2	717			100

PBS(-):35ml				結 果			
方法	BSA濃度	PEG濃度	繰り返し数	実測値平均 (コピー数)	SD	CV	Recovery (%)
1.75BSA-PEG	1.75%	12%	3	252	36	0.14	37
2.0BSA-PEG	2%	12%	3	204	52	0.25	30
PEG沈殿法	—	12%	3	129	48	0.37	19
添加試料			2	684			100

表3 静置時間によるノロウイルスの添加回収率の変化

静置時間	回収BSA量 (mg)	繰り返し 数	実測値平均 (コピー数)	SD	CV	Recovery (%)
1時間	75	5	6776	843.7	0.1	85
15時間	99	5	3578	325.5	0.1	45
添加試料		2	7975			

平成 23 年度厚生労働科学研究費補助金(食品の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

集団胃腸炎事例を対象とした胃腸炎ウイルスの検索

研究協力者	吉澄 志磨	北海道立衛生研究所
研究分担者	田中 智之	堺市衛生研究所
研究協力者	後藤 明子	北海道立衛生研究所
研究協力者	石田勢津子	北海道立衛生研究所

研究要旨

北海道において 2010 年 4 月から 2011 年 7 月までに発生した集団胃腸炎事例を対象に、各種胃腸炎ウイルスの関与について検索を行った。食中毒 13 事例の患者における胃腸炎ウイルス感染の実態調査では、二枚貝の喫食がみられた 7 事例全てでノロウイルス (NoV) が検出され、このうち 3 事例からはその他の胃腸炎ウイルスも検出された。検出ウイルスの組み合わせは、それぞれ「NoV、サポウイルス (SaV)、アイチウイルス (AiV)、アストロウイルス (AstV)」、「NoV、SaV、AiV」、「NoV、AstV」であった。また、調理従事者による食品汚染が原因と考えられた食中毒 6 事例のうち、5 事例は NoV、1 事例は SaV の感染によるものであった。以上の結果から、食品媒介による感染では、NoV 以外に SaV、AiV、AstV の関与が示された。また、感染症事例 116 例を対象とした年齢層別のウイルス感染状況調査では、中学生以上の年齢層において単独感染による集団胃腸炎が確認されたのは、NoV 以外では A 群ロタウイルス (A-RV) のみであった。低年齢層以外でも A-RV による集団感染が示され、成人の集団胃腸炎(食中毒を含む)の起因ウイルスとして注意が必要である。

A. 研究目的

食中毒疑い事例の原因究明におけるウイルス検査の対象は主にノロウイルス (NoV) である。NoV 以外の胃腸炎ウイルスについては、通常、NoV の検出率が低い、または検出されなかった場合についてのみ検査が実施されている。そのため、食中毒起因ウイルスとしての情報量は NoV が突出して多く、その他の胃腸炎ウイル

スについての情報の蓄積は NoV に比べて大幅に遅れている。また、食中毒は学校給食によるものを除くと感染者の多くが成人であることから、原因となるリスクが高いウイルスの条件として、成人で集団感染しやすいという特徴が考えられる。しかし、NoV 以外の胃腸炎ウイルスの感染状況については、小児に関する情報は比較的豊富だが、成人に関する情報は非常

に乏しい。そこで本研究では、食中毒(疑い)事例及び感染症事例を対象に胃腸炎ウイルスの遺伝子検査を行い、各種胃腸炎ウイルスの食中毒への関与の実態と、年齢層別のウイルス感染状況の把握を試みた。

B. 研究方法

1. 調査対象

北海道において2010年4月から2011年7月までに発生した集団胃腸炎139事例(患者糞便770検体)を調査対象とした。ただし、すべての事例について、NoVの検査は実施済みである。

2. 検索ウイルス

NoV以外に、8種類の胃腸炎ウイルス；サポウイルス(SaV)、アストロウイルス(AstV)、アイチウイルス(AiV)、A群ロタウイルス(A-RV)、C群ロタウイルス(C-RV)、アデノウイルス(AdV)、パレコウイルス(PeV)、ボカウイルス(BoV)について検索を行った。

3. ウイルス遺伝子の検出

10%糞便乳剤140 μ lからQIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)を用いて核酸を抽出し、DNaseI (TaKaRa)で処理した後、random hexamer 及び SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen)を用いてcDNA合成を行った。

NoVの検出は、厚生労働省通知の方法(食安監発第1105001号、平成15年11月5日)に準じて行った。他の8種類のウイルスの検出にはマルチプレックスPCR法を用いた。

(1) SaV, AstV, AiV, PeVの検出

cDNAを鋳型とし、PCR試薬には

MultiPlex PCR Assay Kit (TaKaRa)を使用した。プライマーは、SaV : SaV124F, 1F, 5F/SaV1245R (Oka et al, J Med Virol, 78 : 2006)、AstV : PreCAP1/AC230 (Sakamoto et al, J Med Virol, 61:2000, Sakon et al, J Med Virol, 61 : 2000)、AiV : C(+)/C(-) (Yamashita et al, J Clin Microbiol, 38 : 2000)、PeV : ev22+/ev22- (Joki-Korpela et al, Clin Infect Dis, 26 : 1998)を用いた。

(2) AdV, BoVの検出

抽出核酸を鋳型とし、PCR試薬にはMultiPlex PCR Assay Kit (TaKaRa)を使用した。プライマーは、AdV : AdnU-S'2/AdnU-A2 (Miura-Ochiai et al, J Clin Microbiol, 45 : 2007)、BoV : 188F/542R (Allander et al, Proc Natl Acad Sci, 102 : 2005)を用いた。

(3) A-RV, C-RVの検出

抽出核酸を鋳型とし、SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen)を用いてOne Step RT-PCRを行った。プライマーは、A-RV : Beg9/End9 (Gouvea et al, J Clin Microvirol, 28 : 1990)、C-RV : G8S/G8NA2 (葛谷ら, 感染症学雑誌, 77 : 2003)を使用した。

増幅産物について、ダイレクトシーケン法により塩基配列を決定し、目的のウイルス遺伝子であることを確認した。SaVについては、増幅産物のサイズが約100塩基と短く、シーケン法確認が困難であるため、マルチプレックスPCRで増幅バンドが確認された検体についてのみ再度RT-nested PCR及びリアルタイムPCR (Oka et al, J Med Virol, 78 : 2006)