

サポウイルスとして、従来法からは GI. 1, GI. 3, GI. 5, GI. 6, GI. 7, GII. 3, GII. 4, GIV 株が、新規法からは GI. 1, GI. 3, GI. 5, GI. 6, GI. 7, GII. 4, GIV, GV 株が検出された (表参照)。

#### D. 考察

本研究では、2008年の食中毒事例の解析に用いたのと同じのむき身アサリ、1パックあたり20個×3パック、合計60個を対象に検証を行った。2008年の行政検査時点では、各パックに含まれる20個のアサリ中腸腺を1つのプールとして、合計3つのプールサンプルを対象に本研究と同一の手法を用いてサポウイルスの遺伝子解析を行った。アサリから検出された GI. 3, GI. 5, GII. 4 株が食中毒患者糞便から検出された遺伝子型 (塩基配列) と一致したことで、食中毒の原因食材と断定した。(JMV 2010 Iizuka & Oka et al.)

今回は同一のアサリを対象に同一の手法で解析したが、前回とは異なり、患者から検出されていたすべての遺伝子型 (GI. 3, GI. 5, GI. 7, GII. 3, GII. 4) (表参照) が検出された。この違いは前回の解析が、アサリの中腸腺20個分を1つのプールとして検討したのに対し、今回は合計60個をすべて個別に解析したために、より高精度に検出できたためと考えられる。

我々が用いた条件では新規法の方が従来法と比較してサポウイルス核酸陽性率が高かったが、最終的に検出された遺伝子型は従来法と新規法では大きな差は認められなかった (表参照)。なお、GII. 3 株

は従来法のみで、GV 株は新規法のみで検出された (表)。しかし、新規系でも GII. 3 株の検出実績があること (Kitajima et al, Appl. Environ. Microbiol. 76: 2461-2467, 2010)、さらに、従来系でも GV 株の検出実績があること (Harada et al., J. Med. Virol. 81: 1117-1127, 2009) から、本研究で得られた結果は、両検出系の特異性の問題よりは技術的な側面があると考えられる。すなわち微量かつ複数の株が混在するサンプルを対象にした場合、一部の株がより効率的に増幅される可能性と、クローニング操作において、より多く増幅された株が解析対象となりやすい可能性が考えられる。

なお、環境水を対象に従来法と新規法を用いたサポウイルス核酸の検出が報告されており、本研究と同様、検出される遺伝子型は2つの検出系で完全には一致してないことが報告されている (kitajima et al., Appl. Environ. Microbiol. 77: 4226-4229, 2011)

本研究では個別の食用貝に対する複数 (従来法と新規法) の検出系の実施、さらに増幅産物すべてについてクローニング、シーケンス解析、遺伝子型の解析を実施した。このような解析手法には多大な時間とコストを要し、さらに組換え DNA 実験の承認を得なければならないため、実際の検査現場でルーチン的に行うことは現実的ではない。しかし、本研究で得られた結果から、特定の貝 (個体) の抜き取り検査を行う場合、必ずしも患者と同一の株 (塩基配列) の同定に至らない可能性があることが示された。この問題は環境水を通じて多様な遺伝子型の

ウイルスを蓄積すると考えられる食用貝の解析に共通する問題として、今後の食中毒検査の技術的な注意点として留意が必要である。

#### E. 結論

新規法、従来法による PCR 増幅産物のシーケンス解析を行い、アサリ個体間で異なる遺伝子型のサポウイルスが検出される例があること、さらに同一のアサリから異なる遺伝子型のサポウイルスが検出される例があることを明らかにした。従来法より新規法の方が検出率は高かったものの、最終的に検出された遺伝子型は両者で概ね一致した。

本事例では患者と食用貝から同一の遺伝子型(塩基配列)の検出に成功したが、本研究結果から、サンプルの抜き取り検査による解析では、患者と同じ遺伝子型を検出できない可能性があることが示唆された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

(1) Human sapovirus classification based on complete capsid nucleotide sequences. Oka T, Mori K, Iritani N, Harada S, Ueki Y, Iizuka S, Mise K, Murakami K, Wakita T, Katayama K. Arch Virol. 2011 Nov 11. [Epub ahead of print]

##### 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. 検出されたSaVの遺伝子型

Pack 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	陽性数
従来法	-	GI.3	-	-	-	-	-	-	GII.4	GI.3、 GII.4	-	-	偽陽性	GI.3、 GII.4	GI.5、 GIV	GII.4	GII.4	GI.7	GI.6	-	9
新規法	GI.5	GI.5	-	-	GI.5	GI.5	GI.1	GI.5	GI.5	GI.1、 GIV	-	-	GI.3	GI.5、 GI.3	GI.1	GI.5	GII.4	GI.5	GI.5	GI.6	16

Pack 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	陽性数
従来法	GI.3	-	GI.1	-	-	-	GII.4	-	-	GII.3	-	-	-	-	-	-	GI.1	GI.5	GI.1	GII.4	8
新規法	-	GI.5	GI.6	-	-	-	-	GI.7	-	-	-	GI.5	GI.1	-	GI.3	GI.5	GI.5、 GI.6	GI.5、 GI.6	GV	GI.5	11

Pack 3

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	陽性数
従来法	GI.3	GI.6	GI.5	GI.1	-	GII.4	GII.3	-	GI.5	-	-	GI.3、 GIV	-	GI.5	-	-	-	-	-	-	9
新規法	GI.5	GII.4	GI.5	-	-	GI.5	GI.3	-	GI.5	GI.5、 GI.6	-	GI.3、 GII.4	GI.5	GI.3、 GII.4	-	GI.3	GI.5	GI.5	GI.5	-	14

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

## 蛍光 RT-マルチプレックス PCR 法による

### 下痢症ウイルスの検出と解析

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

昨年報告したノロウイルス, サポウイルス, アストロウイルスの蛍光 RT-マルチプレックス PCR 検査の反応試薬に AmpliTaq Gold Fast PCR Master Mix, UP (ABI) を用いることで, 反応時間がこれまでの半分 (1.5 時間) に短縮された。また, 新たにアイチウイルス, ボカウイルス, パレコウイルスの蛍光 RT-マルチプレックス PCR 法を構築し, 有効性が確認された。2010/11 年シーズンの下痢症集団感染事例 (食中毒疑い・感染症) 17 例について下痢症ウイルスの検出を行ったところノロウイルス GII が 13 例, アストロウイルスが 1 例から検出された。検出されたノロウイルス GII.4 の VP1 領域特定 7 部位のアミノ酸変異を調査したところ, 複数事例で確認された変異タイプは 2 つに分類され, 1 つは以前のシーズンとは異なる変異タイプであった。

#### A. 研究目的

下痢症を起こす可能性があるウイルスの包括的検査法 (昨年報告したノロウイルス, サポウイルスおよびアストロウイルス検出用蛍光 RT-マルチプレックス PCR 法) に加え新たにアイチウイルス, ボカウイルスおよびパレコウイルス検出用蛍光 RT-マルチプレックス PCR 法を確立するとともに, 食中毒等の集団感染事例に関与したウイルスの感染実態を明らかにする。また, ノロウイルス GII.4 の VP1 領域の S ドメイン, P2 ドメインのアミノ酸変異を調査し, GII.4 の経年変化

を明らかにすることを目的とした。

#### B. 研究方法

##### 1. 材料

2010/11 年シーズンの食中毒疑い, 感染性胃腸炎集団発生 17 事例, 42 検体の有症者便, 2010/11 年シーズン以前の食中毒疑い, 感染性胃腸炎集団発生 12 事例, 36 検体, 2005-11 年までの小児感染性胃腸炎患者便 148 検体を用いた (表 1)。

##### 2. 蛍光 RT-マルチプレックス法の構築

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。

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°C、10 分、42°C、60 分、99°C、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蛍光マルチプレックス 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) と AmpliTaq Gold Fast PCR Master Mix, UP (ABI) を使用し、表 2 および表 3 に示す SetA および SetB のプライマーと PCR 反応条件により PCR 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. ノロウイルスの遺伝子型別および GII.4 株 VP1 領域のアミノ酸変異検出 ノロウイルス GII の G2SKF/G2SKR の PCR 産物、およびノロウイルス GII.4 の GII.4cap\_5898-5918/GII.4cap\_6415-6394

(福田ら、広島県立総合技術研究所保健環境センター研究報告 2010) の PCR 産物の塩基配列を解析した。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) を用いてダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定した。ノロウイルス GII の遺伝子型はカプシド遺伝子の翻訳開始点から 264bp 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/>) で系統樹を作成し決定した。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.go.jp/pathogen/refer/noro-kaisetu1.html>) に示された分類に従った。ノロウイルス GII.4 については、解析した塩基配列から VP1 領域の S ドメインの 6, 9, 15, 45 番目および P2 ドメインの 296-298, 393-395, 412-414 番目の特定部位のアミノ酸を決定した。

### (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. Fast PCR 酵素を用いた蛍光 RT-マルチプレックス PCR 法の評価

既知検体として食中毒疑い、感染性胃腸炎集団発生 28 事例、75 検体 (2010/11 年シーズン 16 事例、39 検体および 2010/11 年シーズン以前 12 事例、36 検体) を材料に表 2 の SetA プライマーを用い、Multiplex PCR Assay Kit と AmpliTaq Gold Fast PCR Master Mix, UP の比較を行った。検体毎の検出結果では、ノロウイルス GI および GII の重感染 1 検体において Multiplex PCR Assay Kit では両者が検出されたのに対し、AmpliTaq Gold Fast PCR Master Mix, UP ではノロウイルス GI のみが検出された以外は同じ結果となった (表 4)。しかし、事例毎の検出ウイルスは同じ結果であった (表 4)。一方、PCR の反応時間は Multiplex PCR Assay Kit が 3.5 時間要するのに対し、AmpliTaq Gold Fast PCR Master Mix, UP は 1.5 時間であった。

### 2. アイチウイルス、ボカウイルス、パレコウイルスの蛍光 RT-マルチプレック

## ス PCR 法の評価

SetB の蛍光 RT-マルチプレックス PCR 法の有効性について既知検体 160 検体 (2010/11 年シーズンの食中毒疑い, 感染性胃腸炎集団発生 2 事例, 5 検体の有症者便, 2010/11 年シーズン以前の食中毒疑い, 感染性胃腸炎集団発生 4 事例, 7 検体, 2005-11 年までの小児感染性胃腸炎患者便 148 検体) を用いて評価した。アイチウイルス陽性検体, ボカウイルス陽性検体, パレコウイルス陽性検体に対し, それぞれ 519bp (緑), 291bp (橙), 195bp (赤) の増幅バンドが確認された (図 1)。また, 他のウイルスとの交差反応は認められなかった (表 5)。cDNA の 10 倍段階希釈シリーズを用いた検出限界値は, 反応あたり 6~50 コピー程度であった (データ略)。

### 3. 2010/11 年シーズン食中毒疑い, 感染性胃腸炎集団発生事例での検出ウイルス

2010/11 年シーズンの食中毒疑い, 感染性胃腸炎集団発生 17 事例について表 2 の SetA, SetB のプライマーセットで蛍光 RT-マルチプレックス PCR を行ったところ, 13 事例からノロウイルス GII が, 1 事例からアストロウイルスが検出され, その他のウイルスは検出されなかった (図 2)。

### 4. 2010/11 年シーズンに検出されたノロウイルスの遺伝子型と GII.4 株のアミノ酸変異状況

2010/11 年シーズンに検出されたノロウイルスはすべて GII であった。遺伝子型の内訳は GII.2 が 1 事例, GII.4 が 12 事例であった。さらに GII.4 の VP1 領域の S ドメインおよび P2 ドメインの特定部

位のアミノ酸 (6, 9, 15, 45, 296-298, 393-395, 412-414) を詳細に観察すると 4 種類の変異タイプが確認され, そのうち複数の事例で確認されたものは 2 タイプであった (表 6)。過去 5 シーズンでの変遷をみると, この 2 タイプのうち 1 つは昨シーズンから継続する変異タイプ (SNTQSRNSTNIH) であったが, もう 1 タイプは過去には認められていない変異タイプ (SNAQSRNSTTNVP) であった (表 7)。

## D. 考察

SetA (ノロウイルス GI&GII, サポウイルス, アストロウイルス) の蛍光 RT-マルチプレックス PCR 法について, PCR の反応試薬として Multiplex PCR Assay Kit と AmpliTaq Gold Fast PCR Master Mix, UP を比較したところ, 検出結果に差はなく, どちらの試薬を用いても実用上問題ないと思われた。しかし, PCR 反応時間は, AmpliTaq Gold Fast PCR Master Mix, UP の方が Multiplex PCR Assay Kit と比べ半分以下であることから, 迅速検査には AmpliTaq Gold Fast PCR Master Mix, UP が有効であると考えられた。しかし, 使用に際しては, 各ステップの反応時間が短いことからサーマルサイクラーとの相性を事前に確かめておく必要があると思われる。

SetB (アイチウイルス, ボカウイルス, パレコウイルス) の蛍光 RT-マルチプレックス PCR 法については対象ウイルスを問題なく検出できることが確認された。また, アイチウイルス, ボカウイルス, パレコウイルスの検出限界も実用上問題ないと思われた。

広島県内で 2010/11 年シーズンに起きた食中毒・感染症事例について SetA および SetB の蛍光 RT-マルチプレックス PCR 法で検査した結果、検出ウイルスはほとんどノロウイルス GII によるもので、遺伝子型を決定したところ GII.4 が大半を占めた。他県では、GII.2 および GII.3 の検出例が報告されているが、本県では GII.2 が 1 事例で検出されたのみであった。ノロウイルス以外にはアストロウイルスが感染症事例 1 件から確認された。アイチウイルス、ボカウイルス、パレコウイルスが関与した事例は認められなかった。

ノロウイルス GII.4 の VP1 領域における特定部位のアミノ酸の変異について、その変遷を過去 5 シーズンで比較したところ、2010/11 年シーズンに複数事例から確認された 2 タイプのうち 1 つは、2009/10 年シーズンに流行した変異タイプと同型で、もう 1 つは今回新しく確認された変異タイプであった。これまで確認された変異タイプが継続して流行している例はなく、流行は短期で、GII.4 は変遷を繰り返していることがうかがえる。今後の動向について引き続き注視する必要があると考えられる。

#### E. 結論

SetA の蛍光 RT-マルチプレックス PCR 法の反応試薬を AmpliTaq Gold Fast PCR

Master Mix, UP にすることで PCR 反応時間が 1.5 時間まで短縮された。アイチウイルス、ボカウイルス、パレコウイルスの包括的検出法として SetB の蛍光 RT-マルチプレックス PCR 法を確立した。広島県における 2010/11 年シーズンの下痢症集団感染 17 事例（食中毒・感染症）での検出ウイルスはノロウイルス GII によるものが 13 事例、アストロウイルスが 1 事例であった。検出されたノロウイルス GII の遺伝子型はほとんど GII.4 であった。2010/11 年シーズンに検出されたノロウイルス GII.4 の VP1 領域の特定部位のアミノ酸（6, 9, 15, 45, 296-298, 393-395, 412-414）を調査したところ、主に 2 つの変異タイプに分類され、うち 1 つは以前のシーズンとは異なる変異タイプであった。

#### 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1 使用検体の内訳

検体の種類	事例数	検体数
2010/11年シーズン食中毒疑い, 感染性胃腸炎集団発生事例検体	17	42
食中毒疑い事例の有症者便	(6)	(15)
感染性胃腸炎集団発生事例の有症者便	(11)	(27)
2010/11年シーズン以前の食中毒疑い, 感染性胃腸炎集団発生事例検体	12	36
2005-11年の小児感染性胃腸炎患者便検体		148

表2 マルチプレックスPCRの使用プライマー

Set	対象ウイルス	プライマーの組合せと標識蛍光	増幅長	反応液中の濃度	引用
A	ノロウイルスGI	G1SKF (Alexa488)/G1SKR	330bp	各0.4 $\mu$ M	Kojima <i>et al.</i> (2002)
	ノロウイルスGII	G2SKF (Alexa594)/G2SKR, G2ALSKR	344bp	各0.4 $\mu$ M (G2ALSKRは0.2 $\mu$ M)	Kojima <i>et al.</i> (2002) Nishida <i>et al.</i> (2007)
	サポウイルス	SV-F21/SV-R2 (Alexa532)	435bp	各0.2 $\mu$ M	Okada <i>et al.</i> (2002)
	アストロウイルス	AC1' (Alexa350)/AC230	230bp	各0.2 $\mu$ M	Sakon <i>et al.</i> (2000)
B	アイチウイルス	C(+) 6261 (Alexa488)/C(-) 6779	519bp	各0.4 $\mu$ M	Yamashita <i>et al.</i> (2000)
	ボカウイルス	HBoV 01.2 (Alexa546)/HBoV 02.2	291bp	各0.2 $\mu$ M	Albuquerque <i>et al.</i> (2007)
	パレコウイルス	AN345/AN344 (Alexa594)	195bp	各0.4 $\mu$ M	Nix <i>et al.</i> (2008)

表3 マルチプレックスPCRの反応条件

Set	反応試薬	反応条件
A	Multiplex PCR Assay kit	94 $^{\circ}$ C $\cdot$ 1min 94 $^{\circ}$ C $\cdot$ 30sec $\rightarrow$ 57 $^{\circ}$ C $\cdot$ 90sec $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C $\cdot$ 90sec 40cycle 72 $^{\circ}$ C $\cdot$ 10min
		95 $^{\circ}$ C $\cdot$ 10min 96 $^{\circ}$ C $\cdot$ 3sec $\rightarrow$ 57 $^{\circ}$ C $\cdot$ 10sec $\rightarrow$ 68 $^{\circ}$ C $\cdot$ 5sec 40cycle 72 $^{\circ}$ C $\cdot$ 10sec
B	Multiplex PCR Assay kit	94 $^{\circ}$ C $\cdot$ 1min 94 $^{\circ}$ C $\cdot$ 30sec $\rightarrow$ 55 $^{\circ}$ C $\cdot$ 90sec $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C $\cdot$ 90sec 40cycle 72 $^{\circ}$ C $\cdot$ 10min

表4 過去の食中毒・感染症事例検体での検証

PCR反応試薬	検出ウイルス					
	NoVGI	NoVGII	NoVGI & GII	SaV	HAstV	陰性
検体別 (75検体)						
Multiplex PCR Assasy kit	5	54	3	3	1	9
AmpliQ Gold Fast PCR Master Mix, UP	6	54	2	3	1	9
事例別 (27事例)						
Multiplex PCR Assasy kit	2	18	3	1	1	2
AmpliQ Gold Fast PCR Master Mix, UP	2	18	3	1	1	2



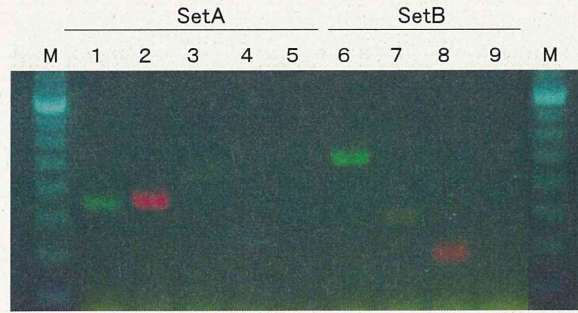


図1. 蛍光RT-マルチプレックスPCRでの電気泳動像

M:100bpラダー, 1:ノロウイルスGI, 2:ノロウイルスGII, 3:サポウイルス,  
4:アストロウイルス, 5:NC, 6:アイチウイルス, 7:ボカウイルス, 8:パレコウイルス

表5 SetBの蛍光RT-マルチプレックスPCR検証結果

検体中のウイルス	検体数	蛍光RT-マルチプレックスPCRの検出結果			
		アイチウイルス	ボカウイルス	パレコウイルス	陰性
ノロウイルスGI	2	0	0	0	2
ノロウイルスGII	2	0	0	0	2
サポウイルス	3	0	0	0	3
アストロウイルス	2	0	0	0	2
アイチウイルス, ノロウイルスGII	1	1	0	0	0
アイチウイルス, ノロウイルスGI & GII	2	2	0	0	0
アイチウイルス, A群ロタウイルス	1	1	0	0	0
A群ロタウイルス	3	0	0	0	0
A群ロタウイルス, ボカウイルス	1	0	1	0	0
C群ロタウイルス	1	0	0	0	1
腸管アデノウイルス	2	0	0	0	2
ボカウイルス	3	0	3	0	0
パレコウイルス	9	0	0	9	0
ポリオウイルス(ワクチン株)	1	0	0	0	1
コクサッキーウイルスB-2	1	0	0	0	1
陰性	126	0	0	0	126
計	160	4	4	9	140

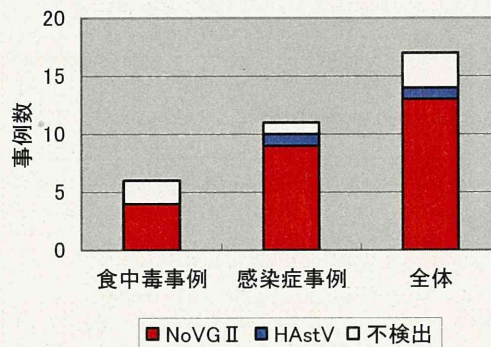


図2 2010/11年シーズンの下痢症集団感染事例からの検出ウイルス

表6 2010/11年シーズンのNoV GII.4検出株のVP1領域における特定アミノ酸の変異状況

事例番号	検体番号	アミノ酸の位置												
		6	9	15	45	296	297	298	393	394	395	412	413	414
227	1	S	N	A	Q	S	R	N	S	T	T	N	V	P
	2	N	N	A	Q	S	R	N	S	T	T	N	V	P
228	1	S	N	A	Q	S	R	N	S	T	T	N	V	P
	2	S	N	A	Q	S	R	N	S	T	T	N	V	P
	3	S	N	A	Q	S	R	N	S	T	T	N	V	P
	5	S	N	A	Q	S	R	N	S	T	T	N	V	P
229	1	S	N	A	Q	S	R	N	S	T	T	N	V	P
231	1	S	N	A	Q	S	R	N	S	T	T	N	V	P
	2	S	N	A	Q	S	R	N	S	T	T	N	V	P
232	1	S	N	A	Q	S	R	N	S	T	T	N	V	P
233	2	S	N	A	Q	S	R	N	S	T	T	N	V	P
234	1	S	N	A	Q	S	R	N	S	T	T	N	V	P
	4	S	N	A	Q	S	R	N	S	T	T	N	V	P
235	1	S	N	A	Q	S	R	N	S	T	T	N	V	P
237	2	S	N	T	Q	S	R	N	S	T	T	N	I	H
238	1	S	N	A	Q	S	R	N	S	T	T	N	V	P
	2	S	N	A	Q	S	R	N	S	T	T	N	V	P
239	1	N	N	A	Q	S	R	N	S	T	T	N	V	H
240	3	S	N	T	Q	S	R	N	S	T	T	N	I	H

表7 流行シーズン毎にみた変異タイプの変遷

変異タイプ <sup>1)</sup>	流行シーズン				
	06/07	07/08	08/09	09/10	10/11
NNAQTRNGTTNVH	● <sup>2)</sup>				
NNAQSRNSTTNVH	●	△	●		△
NNATSRNSTTNVH	●	△			
NSAQSRNSTTNVH	△ <sup>3)</sup>				
SNAQSRNSTTNVH	△				
NNAQSRNGTTNVP		●		●	
NNATSRNSTTNAQ		△			
NNATSRNGTTNVH		△			
NNAQSRNGTTNVH			●		
NNAQSHNGTTNVQ				△	
SNTQSRNSTTNIH				●	●
SNTQSRNSTTNTH				△	
SNAQSRNSTTNVP					●
NNAQSRNSTTNVP					△

<sup>1)</sup> VP1領域の6, 9, 15, 45, 296-298, 393-395, 412-414番目のアミノ酸を示す

<sup>2)</sup> 複数事例から確認されたタイプ

<sup>3)</sup> 単発事例でのみ確認されたタイプ

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

## Multiplex real-time PCR を 利用した腸管系ウイルス検査の検討

研究協力者	小和田 和誠	福井県衛生環境研究センター
研究分担者	田中 智之	堺市衛生研究所
研究協力者	中村 雅子	福井県衛生環境研究センター
研究協力者	平野 映子	福井県衛生環境研究センター
研究協力者	大村 勝彦	福井県衛生環境研究センター

### 研究要旨

ノロウイルス以外の腸管系ウイルス 6 種 (サポウイルス、アストロウイルス、A 群ロタウイルス、C 群ロタウイルス、腸管系アデノウイルス、エンテロウイルス) について検査対応を迅速化するために、Multiplex real-time PCR 法の導入を検討した。Multiplex real-time PCR を、アニーリング温度は 57°C、プライマー・プローブ濃度は各 0.2 μM の条件に設定することで良好な検出感度が得られた。2009 年 4 月から 2011 年 12 月の間に採取された感染性胃腸炎疑い小児散発例患者 96 検体について、本研究で設計した Multiplex real-time PCR 法を実施したところ 43 検体からノロウイルス以外の腸管系ウイルスを検出した。また、同期間内の集団発生事例 51 事例 449 検体については、3 事例 9 検体からノロウイルス以外の腸管系ウイルスを検出した。

### A. 研究目的

非細菌性食中毒あるいは地域流行として小児に蔓延する感染性胃腸炎は、毎年患者発生数が多い疾病の一つであり、その発症要因として多様なウイルス種の関与が指摘されている。しかしながら、ウイルスの個別検査は多くの時間を要し、食中毒などの集団発生事例への迅速な検査対応が困難となる。そこで、本研究では複数のウイルス遺伝子を同時に増幅す

る Multiplex real-time PCR 法の導入を検討し、より迅速な検査体制の構築を目的とした。

### B. 研究方法

#### 1. 材料

2009 年 4 月から 2011 年 12 月の間に採取された感染性胃腸炎疑い小児散発例患者の糞便 96 検体および食中毒等の集団発生 51 事例の糞便 449 検体を用いた。

陽性対照検体には、サポウイルス、A群ロタウイルス、腸管系アデノウイルスおよびエンテロウイルスについては、過去に当センターでウイルス陽性となった糞便検体を用いた。その他については、岡山県環境保健センターより分与されたC群ロタウイルス陽性糞便および愛媛県立衛生環境研究所より分与されたアストロウイルス陽性糞便を用いた。

## 2. 方法

糞便検体を滅菌水で10%乳剤とし、粗遠心後の上清を試料とした。試料から、QIAamp Viral RNA mini kit[QIAGEN]を用いて核酸を抽出した。そして、ランダムプライマー(Nona-deoxyribonucleotide mixture)[TaKaRa]およびSuper Script III Reverse Transcriptase[Invitrogen]を用いた逆転写反応(表1)により、cDNAを合成し、これをMultiplex real-time PCRのテンプレートとした。

PCR反応は、QuantiTect Multiplex PCR Master mix [QIAGEN]を用いた反応条件で実施した(表2)。使用したプライマーおよびプローブは表3に示し、Aセット(サポウイルス・アストロウイルス・C群ロタウイルス)もしくはBセット(エンテロウイルス・アデノウイルス・A群ロタウイルス)の組み合わせで実施した。ノロウイルスはcDNA合成後、国立感染症研究所発行のウイルス性下痢症診断マニュアルのリアルタイムPCR法に準じて検査した。real-time PCR装置は、StepOne Plus [Applied Biosystems]を使用した。

(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. Multiplex real-time PCR条件の検討  
各ウイルスの検出系にはそれぞれ最適なPCR反応条件が存在する。しかし、Multiplex real-time PCRを実施するためには検出対象ウイルスのPCR条件を統一しなければならない。そのため、いずれのウイルスも特異的かつ良好な感度で検出されるPCR条件を検討した。

サポウイルス、アストロウイルス、A群ロタウイルス、C群ロタウイルス、腸管系アデノウイルス、エンテロウイルスの陽性対照検体について、Multiplex real-time PCR実施時のアニーリング温度を、54°Cから64°Cの間で検討したところ、56-58°Cで実施した場合に比較的良好な検出感度が得られた(図1)。また、PCRに用いるプライマーおよびプローブの濃度を0.1μMから0.4μMの間で検討したところ、Multiplex real-time PCR kit [QIAGEN]にて推奨されている0.2μMでも十分に良好な検出感度が得られた(図2)。以上の成績から、アニーリング温度は57°C、プライマーおよびプローブ濃度は各0.2μMと定めMultiplex real-time PCRを実施した。

## 2. 小児散発例患者からの検出

2009年4月から2011年12月の間に採取された感染性胃腸炎疑い小児散発例患者糞便96検体について、Multiplex real-time PCRを実施した。

ノロウイルス陰性の糞便64検体については、33検体(51.6%)からウイルスが検出された。内訳は、サポウイルスが7検

体、アストロウイルスが 2 検体、A 群ロタウイルスが 14 検体、アデノウイルスが 8 検体およびエンテロウイルスが 12 検体であった。この中には重複感染の 9 検体（サポウイルスとエンテロウイルスの同時検出が 1 検体、サポウイルスと A 群ロタウイルスの同時検出が 2 検体、アストロウイルスとエンテロウイルスの同時検出が 1 検体、アデノウイルスとエンテロウイルスの同時検出が 2 検体、A 群ロタウイルスとエンテロウイルスの同時検出が 2 検体、サポウイルスとアデノウイルスと A 群ロタウイルスの同時検出が 1 検体）が含まれていた。

また、ノロウイルス陽性の糞便 32 検体で、10 検体（31.3%）からウイルスが検出された。内訳は、アデノウイルスが 2 検体およびエンテロウイルスが 8 検体であった（表 4）。

### 3. 集団発生事例からの検出

2009 年 4 月から 2011 年 12 月の間に発生した集団発生事例 51 事例 449 検体について、Multiplex real-time PCR を実施した。

ノロウイルスが検出されなかった集団発生事例 20 事例 114 検体では、1 事例において A 群ロタウイルスおよびエンテロウイルスが 1 検体ずつ検出された（表 5、事例 A）。

ノロウイルスが検出された集団発生事例 31 事例 335 検体（有症者等のノロウイルス陽性 211 検体、調理従事者等のノロウイルス陰性 124 検体）から、サポウイルスとアストロウイルスの同時検出が 1 検体の事例（表 5、事例 B）と、C 群ロタウイルスが 4 検体、サポウイルスが 1 検体、アデノウイルスが 1 検体検出された

事例（表 5、事例 C）があった。

### D. 考察

サポウイルス、アストロウイルス、C 群ロタウイルスの同時検出系と、A 群ロタウイルス、腸管系アデノウイルス、エンテロウイルスの同時検出系を構築することで、これらのウイルスの検索に要する時間を大幅に削減することができた。食中毒などの緊急時対応に非常に効果的な検出系であると考えられる。

2009 年 4 月から 2011 年 12 月の間に発生した感染性胃腸炎集団発生事例において、検出された全てのウイルスの中で、ノロウイルスが約 95% を占めた。そのため、集団発生の際には、まず初めにノロウイルスの検査を実施し、結果が陰性の場合等、ノロウイルスの関連性が低い場合に他のウイルスの検索を実施することが効率的だと考えられる。

集団発生事例において、ノロウイルス以外のウイルスが検出された検体は 3 事例 9 検体（表 5）であった。

事例 A は、旅館を利用した 1 グループで下痢等を発症したが、ノロウイルスおよび細菌が検出されない原因不明事例であった。A 群ロタウイルスとエンテロウイルスが異なる患者から 1 検体ずつ検出された。この事例では、散发例患者が混在していたと考えられた。

事例 B は、飲食店での食中毒疑い事例で、サポウイルスとアストロウイルスの同時検出が 1 検体であった。この検体からは、ノロウイルス（G I・G II）も検出されていた。この事例では、他の喫食者からも多様なノロウイルスが検出され

たが、二枚貝の喫食はなかった。

事例Cは、中学校とその中学校区内にある小学校2校および保育園の4施設で集団発生した感染症疑いの事例であった。3施設（中学校、B小学校、保育園）から搬入された6検体のうち5検体からノロウイルスが検出された。その中に、サポウイルスの同時検出が1検体およびアデノウイルスの同時検出が1検体含まれていた。残る1施設（A小学校）の4検体全てからC群ロタウイルスが検出された。これにより、検査前は原因が同一事例であると考えられていたが、C群ロタウイルスが検出された小学校では、他の施設と感染源が異なることが示唆された。ノロウイルス陽性事例であっても、ノロウイルス陰性の検体がある場合には、Multiplex real-time PCRで他のウイルスの検索を実施する必要があると考えられた。

2009年4月から2011年12月の間に採取された感染性胃腸炎疑い小児散発例患者96検体から、ノロウイルスが最も多く32検体(33.3%)から検出されているが、それ以外のウイルスも合計43検体

(44.8%)から検出されている。この成績は、ノロウイルス以外のウイルスが集団発生の誘発因子となる可能性は十分にあることを示唆している。

以上から、ノロウイルス以外のウイルスについてMultiplex real-time PCRを利用して検索する機会は今後多くなると考えられる。今後も調査を継続して検査数を増やし、どのような場合にMultiplex real-time PCRを利用すると効果的な食中毒原因究明に寄与できるか、あるいは

ノロウイルス以外のウイルスがどのような過程で食中毒事例に関与しているのか検討する必要がある。

## E. 結論

多様な腸管系ウイルスの検索を迅速に行うために、Multiplex real-time PCR法の導入を検討した。

本研究で設計したMultiplex real-time PCR法では、サポウイルス、アストロウイルス、A群ロタウイルス、C群ロタウイルス、腸管系アデノウイルス、エンテロウイルスを検出が可能であった。

集団発生事例では、初めにノロウイルスを検索し、ノロウイルスの関与が低い場合、もしくは他のウイルスの混合感染が疑われる場合に、他の腸管系ウイルスの検索をMultiplex real-time PCR法で実施する方法が効果的であった。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

小和田和誠，中村雅子，平野映子，大村勝彦，東方美保：マルチプレックスリアルタイムPCR法を利用した腸管系ウイルスの検出. 第39回北陸公衆衛生学会，2011年11月，福井県福井市

## 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. 逆転写反応

【RT 反応液組成 (1 検体分)】

5×First Strand buffer	4.00 $\mu$ L
DTT (100mM)	2.00 $\mu$ L
dNTP mix (10mM)	1.00 $\mu$ L
random primer (1 $\mu$ g/ $\mu$ L)	0.50 $\mu$ L
RNase inhibitor (40 U/ $\mu$ L)	0.25 $\mu$ L
SuperScript III (200 U/ $\mu$ L)	1.00 $\mu$ L
RNA	10.00 $\mu$ L
dH <sub>2</sub> O	1.25 $\mu$ L
Total	20.00 $\mu$ L

【RT 反応条件】

30 °C	10min
50 °C	60min
98 °C	5min

表 2. Multiplex real-time PCR 反応

【PCR 反応液組成 (1 検体分)】

2×QuantiTect Master mix	10.0 $\mu$ L
primer/probe (each 0.2 $\mu$ M)	1.0 $\mu$ L
primer/probe (each 0.2 $\mu$ M)	1.0 $\mu$ L
primer/probe (each 0.2 $\mu$ M)	1.0 $\mu$ L
DNA	2.0 $\mu$ L
dH <sub>2</sub> O	5.0 $\mu$ L
Total	20.0 $\mu$ L

【PCR 反応条件】

95 °C	15min	} 45 Cycles
94 °C	60sec	
57 °C	90sec	

表 4. 小児散発例からのウイルス検出状況 (2009 年 4 月～2011 年 12 月)

ウイルス検出数 (n=96)		
ノロウイルス		32
Multiplex	サポウイルス	8
	アストロウイルス	2
	A 群ロタウイルス	14
	C 群ロタウイルス	0
	腸管アデノウイルス	10
	エンテロウイルス	20

混合感染検体の内訳		
ノロウイルス+腸管アデノウイルス		2
ノロウイルス+エンテロウイルス		8
サポウイルス+A 群ロタウイルス		2
サポウイルス+エンテロウイルス		1
アストロウイルス+エンテロウイルス		1
腸管アデノウイルス+エンテロウイルス		2
A 群ロタウイルス+エンテロウイルス		2
サポウイルス+腸管アデノウイルス+A 群ロタウイルス		1

表3. Multiplex real-time PCR に使用したプライマーおよびプローブ

検索 ウイルス	プライマー およびプローブ	Sequence / (Reporter-Quencher)	方向	出典
サポ ウイルス	SaV124F	GAYCASGCTCTCGCYACCTAC	+	Oka et al, J. Med. Virol, 78 (2006)
	SaV1F	TTGGCCCTCGCCACCTAC	+	
	SaV5F	TTTGAACAAGCTGTGGCATGCTAC	+	
	SaV1245R	CCCTCCATYTCAAACACTA	-	
	SaV124TP	CCRCTATRAACCA (FAM-MGB)	-	
	SaV5TP	TGCCACCAATGTACCA (FAM-MGB)	-	
A群ロタ ウイルス	JVKF	CAGTGGTTGATGCTCAAGATGGA	+	Jothikumar et al, J. Virol. Methods, 155 (2009)
	JVKR	TCATTGTAATCATATTGAATACCCA	-	
	JVKP	ACAACTGCAGCTTCAAAGAAGWGT (TAMRA - BHQ)	+	
C群ロタ ウイルス	CRV7F	GCTGCATTTGGTAGTGACTGYGA	+	Mori et al, 日本ウイルス学会 にて報告(2009)
	CRV7R	AGTTTCTGTACTAGCCGGTGAACA	-	
	CRV7	TCTGTCTGTCCATTAGATACTACAAGTAATGGAATYGG (TAMRA - BHQ)	+	
アストロ ウイルス	Hast. fwd	TCAACGTGCCGTAAMATTGTCA	+	Logan et al, J. Virol. Methods, 146 (2007)
	HastV. rev	TGCWGGTTTTGGTCCTGTGA	-	
	HastV. probe1+2	CAACTCAGGAAACARG (VIC-MGB)	+	
アデノ ウイルス	JTVXF	GGACGCCTCGGAGTACCTGAG	+	Jothikumar et al, Appl. Environ. Micro biol, 71 (2005)
	JTVXR	ACIGTGGGTTTCTGAACTGTGT	-	
	JTVXP	CTGGTGCAGTTCGCCGTGCCA (VIC-MGB)	+	
エンテロ ウイルス	EnteroPrimer1F	TCCTCCGGCCCTGA	+	Nijhuis et al, J. Clin. Microbiol, 40 (2002)
	EnteroPrimer1R	RATTGTCACCATAAGCAGCCA	-	
	EnteroTaqman1	CGGAACCGACTACTTTGGGTGWCCGT (FAM-MGB)	+	



表5. 集団発生事例でノロウイルス以外の腸管系ウイルスが陽性となった事例

事例 No.	発生日	原因施設 (推定)	検体 No.	種類	備考	real-time PCR		Multiplex real-time PCR					
						Noro		Sapo	Rota		Adeno	Astro	Enterov
						G I	G II		A	C			
A	2009.10.17	旅館	1	便	喫食者	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
			2	便	喫食者	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
			3	便	喫食者	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
			4	便	喫食者	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
			5	便	喫食者	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
B	2010.2.27	飲食店	1	便	従事者	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
			2	便	喫食者	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
			3	便	喫食者	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
			4	便	喫食者	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
			5	便	喫食者	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
			6	便	従事者	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
			7	便	従事者	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
			8	便	従事者	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
			9	便	従事者	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
			10	便	従事者	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
C	2011.5.27	中学校 A 小学校 B 小学校 保育園	1	便	保育園児	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
			2	便	A 小学生	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
			3	吐物	A 小学生	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
			4	便	中学生	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
			5	便	保育士	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
			6	便	A 小教諭	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
			7	便	中学生	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
			8	便	A 小学生	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
			9	便	A 小学生	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
			10	便	B 小学生	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

図1. アニール温度の検討

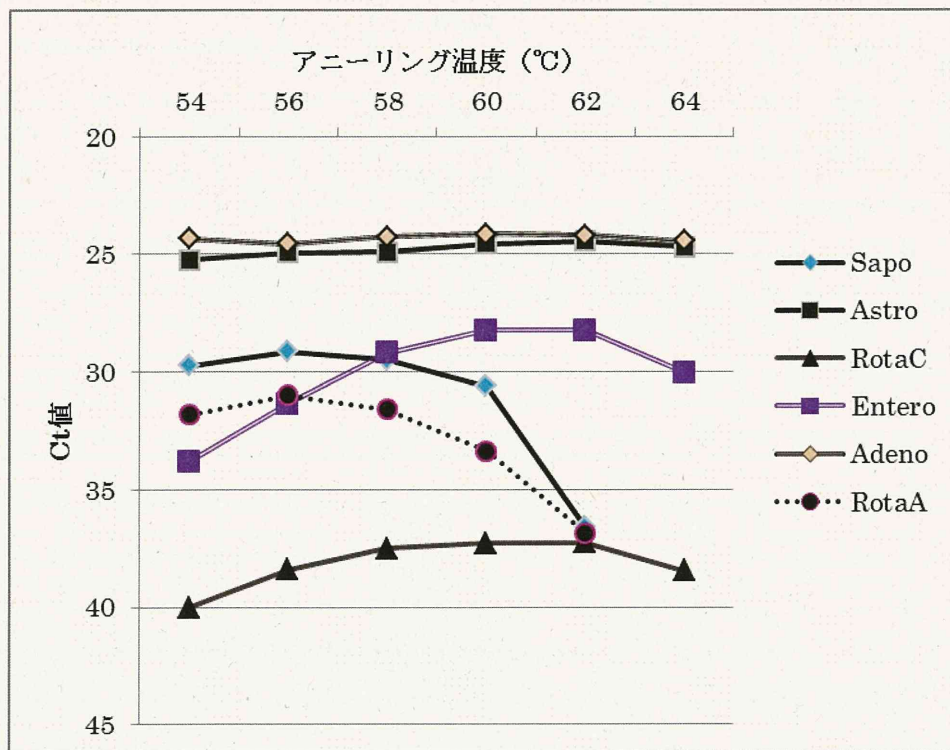
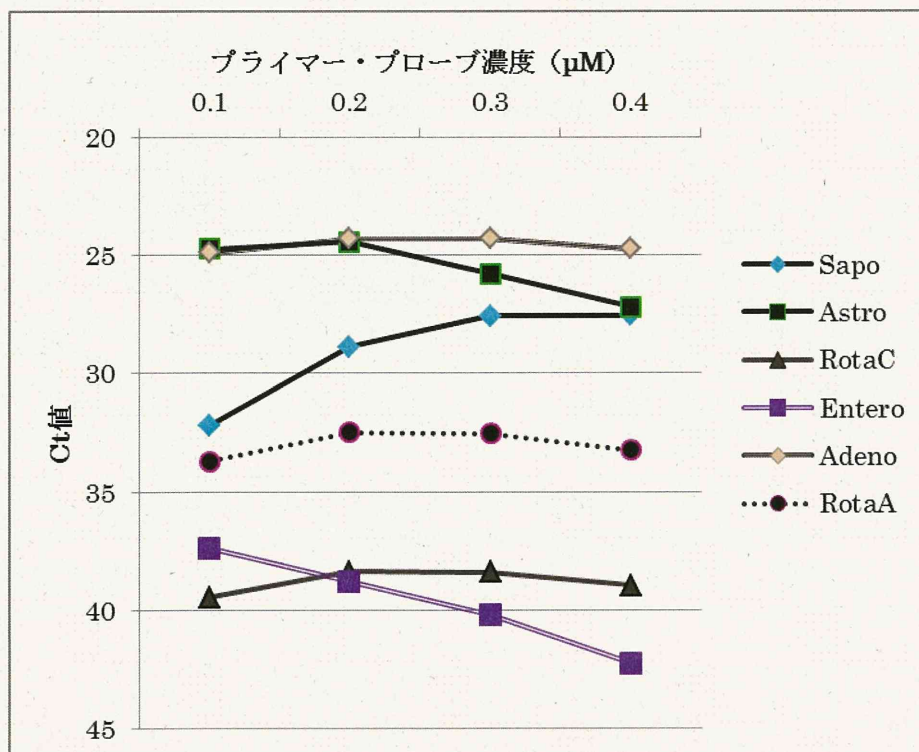


図2. プライマーおよびプローブの濃度の検討



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

終末処理場の処理前の下水及び生カキにおける  
ノロウイルス・A 型肝炎ウイルス等汚染実態調査

研究協力者	三上 稔之	青森県環境保健センター
研究分担者	田中 智之	堺市衛生研究所
研究協力者	吉田 綾子	青森県環境保健センター
研究協力者	井上 治	青森県環境保健センター
研究協力者	筒井 理華	青森県環境保健センター

### 研究要旨

下水処理施設に流入する処理前の下水中のウイルス検出を実施することにより、本県における汚染実態を明らかにし、散発及び集団事例との関連を分子疫学的に比較検討した。下水を経時的に採取し、モニタリングした結果、合流水では、29 検体中 NVG I は 25 検体、NV G II は 26 検体、AstV は 27 検体から検出された。分流水では、NVG I、NV G II、AstV は 29 検体全て、SV は 1 検体から検出された。合流水から HAV、EV 及び SV は検出されなかった。分流水から HAV 及び EV は検出されなかった。ダイレクトシーケンス法にて、Capsid 領域の遺伝子解析を実施したが、複数の遺伝子が混在しており、遺伝子を特定することができなかったが、クローニングすることにより複数の NV 遺伝子を解析することができた。科学的根拠に基づいたウイルス発生動向を把握することで、地域で発生する食中毒の拡大防止対策に寄与することができると考えられた。

また、市販生カキは中腸腺に様々なウイルスを蓄積することが知られていることから、生カキ及びパック内浮遊水の汚染実態を明らかにし、リスク評価の基礎資料とするため、NV・SV・AstV 及び HAV の遺伝子検出を実施したが、いずれの遺伝子も検出されなかった。

#### A. 研究目的

ノロウイルス(NV)、サポウイルス(SV)、アストロウイルス(AstV) およびエンテロウイルス(EV) は、下痢等を主症状とするウイルス性胃腸炎の原因ウイルスで

ある。中でも、NVは食中毒事例において2001年以降、毎年食中毒患者数が最多であるなど、食品衛生上注意を要するウイルスである。

上述のウイルスは、手指や調理器具等

を汚染し、食品や飲料水を介して経口感染する。感染者の腸内で増殖し、糞便中に排泄され、下水や河川水に流れ込むと考えられる。このことから、下水処理施設に流入する処理前の下水中のウイルス検出を実施することにより、本県における汚染実態を明らかにし、散発及び集団事例との関連を分子疫学的に比較検討するため、下水を経時的に採取し、モニタリングすることを目的とした。

また、A型肝炎ウイルス (HAV) は、上下水道が整備されている先進国では患者が少ないものの、国内では依然年間200例前後の患者が報告され、劇症肝炎症例も含まれる。カキやその他の魚介類が原因食品とする多くの報告があり、国内の経口感染例の9割は、カキ・寿司を含む魚介類によるものと推定されたとの報告がある。これを踏まえてHAVについてもNV等と併せて下水の汚染実態調査を行った。

一方、市販生カキは中腸腺に様々なウイルスを蓄積することが知られている。市販生カキのNV等汚染は、家庭や飲食店などでの取り扱いにより食中毒や感染症の原因になる可能性があり、NV、SV、AstV およびHAVについて、生カキおよびパック内浮遊水の汚染実態を明らかにし、リスク評価の基礎資料とする。

## B. 研究方法

### 1. 材料

#### (1) 下水流入水

下水処理施設の流入水は、2011年1月～12月に採水した合流水29検体及び分流水29検体(2～4回/月)について、調査を実施した。

#### (2) 市販生食用カキ

市販生食用カキは、2011年1月～3月に購入した9パック(3回/月購入、中腸腺18検体及びパック内浮遊水9検体)について調査を実施した。検体番号は、1パックの生食用カキを等分にし、枝番を付した(7-1～15-2)。パック水は、生食用カキと同じ番号とした(7～15)。

## 2. 方法

### (1) 検体処理

合流水及び分流水各1Lを3,000 rpm、20分間冷却遠心後、上清にポリエチレングリコール6000を8%、0.5 M NaCl溶液を添加し(以下、PEG濃縮という)、常温で2時間攪拌した。その後、3,000 rpm、20分間冷却遠心し、沈渣を(-)PBS1.0 mLに懸濁した。再度3,000 rpm、20分間遠心し、上清を濃縮検体として使用した。

市販生カキは、1パックを2等分し、中腸腺を4～5個プールしたものを1検体とし、7倍量の滅菌蒸留水を添加、ホモジナイズ後、10,000 rpm、20分間冷却遠心した。遠心上清に等量の20%ポリエチレングリコール・1 M NaCl溶液を加え、4℃で4時間静置後、3,000 rpm 20分間冷却遠心し、沈渣に滅菌蒸留水400 µLを添加し測定検体とした。

パック水は、ポリエチレングリコール6000を10%、NaClを2.1 g/100 mLになるように加え、ポリエチレングリコール及びNaClが完全に溶解した後、4℃で4時間～一晩静置し、3,000 rpm 20分間冷却遠心した。沈渣に滅菌蒸留水2 mLを添加し、3,000 rpm 20分間冷却遠心し、上清を30%ショ糖溶液に重層し、40,000