

互いに相関運動し、その一方で、P1 ドメインとは逆相関運動する。この部位は機能的に重要であると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) Yokoyama M, Oka T, Kojima H, Nagano T, Okabe T, Katayama K, Wakita T, Kanda T, Sato H. Structural Basis for Specific Recognition of Substrates by Sapovirus Protease. *Front. Microbio.* 3:312, 2012. (The first two authors contributed equally)

2. 学会発表

(1) Chen N, Wang Q, Zhang Z, Pinto P, Yokoyama M, Saif LJ. Molecular mechanism of cell culture adaptation of swine

sapovirus. The 31st Annual Meeting, the University of Wisconsin-Madison, July 21 - 25, 2012.

(2) 佐藤 裕徳、本村 和嗣、横山 勝、椎野 禎一郎、中村 浩美、岡 智一郎、片山 和彦、野田 衛、田中 智之. パンデミックノロウイルスの変化の制約. 第60回日本ウイルス学会学術集会, 大阪, 2012.

G. 知的財産権の願・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

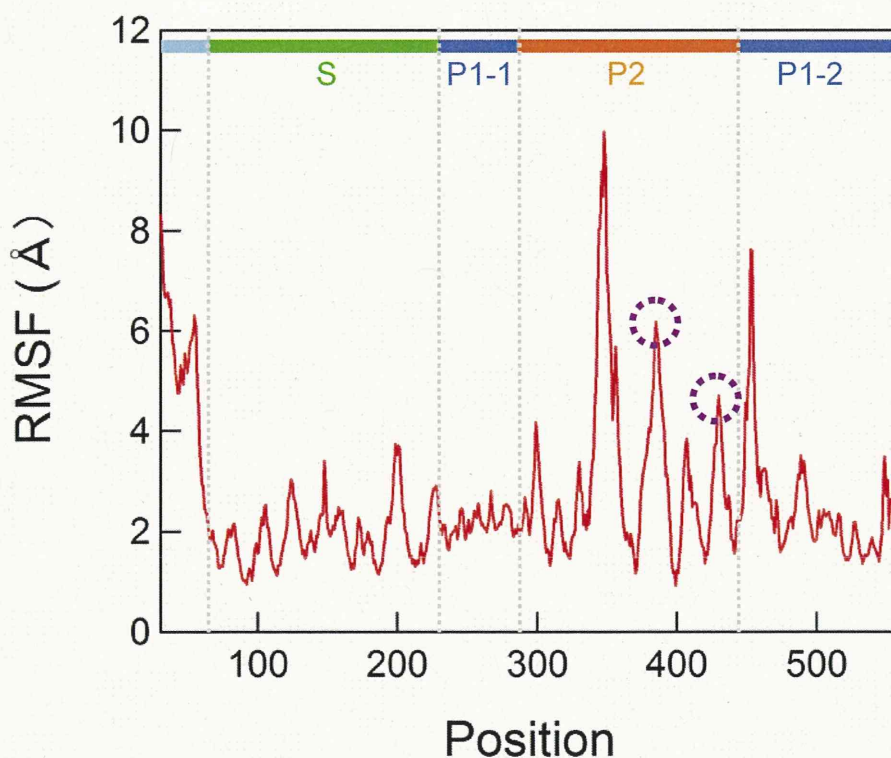


図 1. サポウイルスカプシド蛋白質の各座位の C α の RMSF (root mean square fluctuation: 根平均二乗ゆらぎ)。

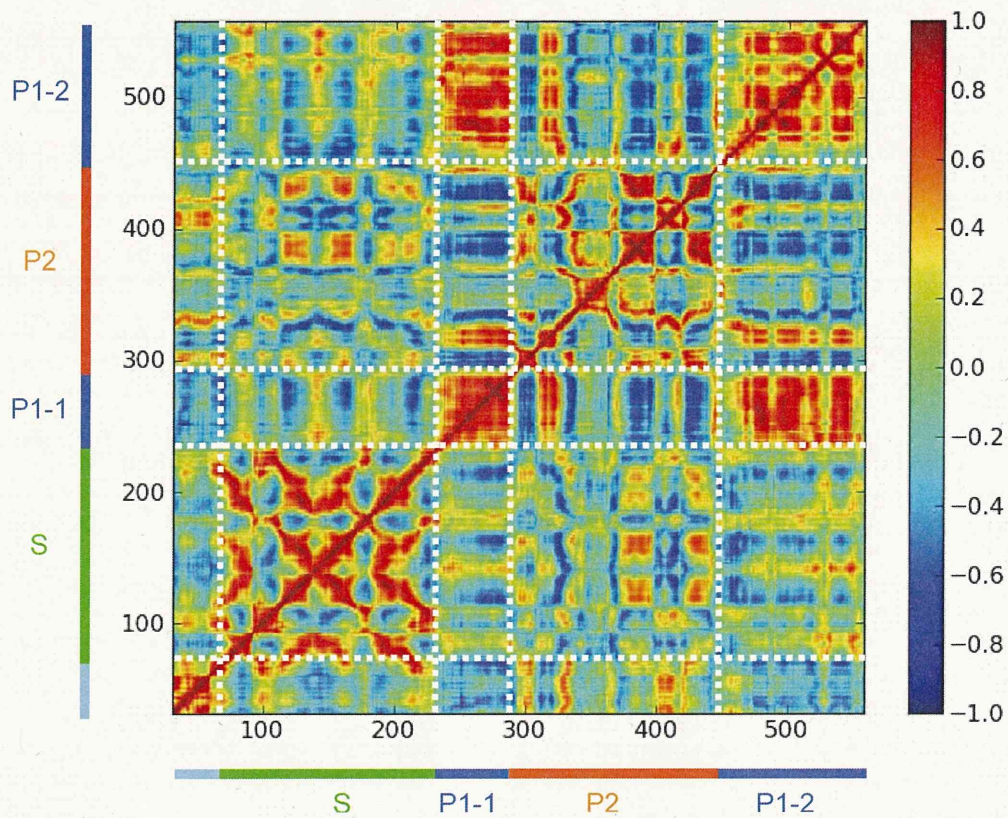


図2. サポウイルスカプシド蛋白質のDCCM (Dynamics Cross Correlated Motion:動的相互
 相関運動)。1.0に近ければ正の相関運動を示し、-1.0に近ければ負の相関運動を示す。

平成 24 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」

平成 24 年度研究分担報告書

ノロウイルス中空粒子および抗血清の作製、
ウイルス定量システム法の開発

研究分担者	片山 和彦	国立感染症研究所	ウイルス第 2 部
研究協力者	村上 耕介	国立感染症研究所	ウイルス第 2 部
研究協力者	朴 英斌	国立感染症研究所	ウイルス第 2 部
研究協力者	戸高 玲子	国立感染症研究所	ウイルス第 2 部

研究要旨

ヒトに感染するノーウォークウイルス（ノロウイルス、HuNoV）は、冬季ウイルス性胃腸炎の原因ウイルスとして、更に冬季に多発する集団食中毒の原因ウイルスとして知られている。本研究では、免疫沈降に用いる抗ノロウイルス抗体、それを作製する抗原として、ウイルス様中空粒子を供給すること、さらに、ノロウイルス検出システムの開発と、それに用いる標準物質の開発を行った。最終年度は、次世代の世界標準となるノロウイルスの genotyping system に対応可能であり、かつ遺伝子組み換え解析に対応した標準プラスミド DNA の改良と、検出システムの改良を行った。

A. 研究目的

ノーウォークウイルス（ノロウイルス、HuNoV）はヒト、ブタ、ウシ、マウス、イヌなどに感染する。ヒトノロウイルス（HuNoV）は、冬季ウイルス性胃腸炎、冬季に多発する非細菌性食中毒の原因ウイルスとして知られている。NoV は構造蛋白質（VP1）をコードする領域の塩基配列情報に基づき、5つの genogroup（GI, GII, GIII, GIV, GV）に分別されることが知られている。このうち、ヒトに感染するのは、GI, GII, GIV である。GIII はウシ、GV はマウスに感染する NoV である。HuNoV GI, GII は、更に複数の genotype クラスタに分別可能であり、2010 年現在、GI には genotype が 17 以上、GII には genotype が 19 以上存在することが報告されている。

現在、ゴールドスタンダードとして世界的に広く使用されている HuNoV の genotyping 法は、

ORF2 の 5' 末端 300 塩基ほど（キャプシド N/S 領域）を用いる。この方法による genotyping は、HuNoV の抗原性を反映することができ、HuNoV の抗原性変化を予測できるため、分子疫学研究のスタンダードとして用いられてきた。しかし、本方法は、ORF1 領域をカバーしておらず、HuNoV の genome recombination によって生じるキメラウイルスの解析はできない。キメラウイルスの検出には、少なくとも ORF1-ORF2 ジャンクション領域よりも 500~800nt 上流からキャプシド N/S 領域までの 1000nt 以上の遺伝子配列解析が必要になる。

昨年度は、上記領域を含む全長約 1500nt をクローニングした新しいスタンダードプラスミドを作製するとともに、標的領域を増幅可能な GI, GII それぞれのユニバーサルプライマーをデザインし、新たな検出システム構築を試みた（これを

第一世代プライマーセットとする)。しかし、HuNoV の約 80% の genotype を含む HuNoV 陽性糞便パネルを用いた検出率を検討した結果、その検出率は約 70~75% であった。また、第一世代プライマーセットの増幅産物は Capsid N/S region をカバーするが、ORF2 (VP1) 全長をカバーしていない。従って、本方法で新規 genotype 候補が見つかった場合には、ORF2 の全塩基配列を決定するため、新たに ORF2 (VP1) 全長を増幅しなおす必要があった。

最終年度は、来年度より Norovirus scientific committee によって刷新される新規 genotyping 法に完全に対応し、かつ Capsid N/S region を用いた従来の genotyping、さらに ORF2 (VP1) 全長をカバー可能な増幅領域を持つ第二世代プライマーセット、RT-PCR 法を構築することを目的とした。

B. 研究方法

1. 便検体

埼玉県衛生研究所より、譲渡され、国立感染症研究所ウイルス第二部第一室で保管管理されている NoV 陽性便検体パネルを用いた。本パネルは、譲渡後も国立感染症研究所にて新規 genotype 便検を補充し、現在報告されているほぼすべての genotype を含むパネルとして継続的に維持している。加えて、本年度は、2012/13 シーズンに史上 2 番目の大流行を引き起こした GII/4 2012 変異株の便検体 (新潟県・田村先生、北海道・吉澄先生、台湾 CDC の Wu 先生より提供を受けた) も用いた。

2. HuNoV の全塩基配列解析

全長塩基配列は、次世代 sequencer (イルミナ MiSeq) によって解析を行い、ドラフトシーケンスを作製後、それぞれの株特異的なプライマーをデザインし、Hi fidelity PCR enzyme prime STAR GXL (TAKARA) を用いて互いにオーバーラップする上流 4kb、下流 4kb の PCR フラグメントを増幅した。それぞれをドラフトシーケンスからデザインした primer によって PCR direct sequence を行って決定した。

3. 第一世代 primer デザインと RT-PCR

HuNoV 全長塩基配列のアライメントを用いて、高度に保存された領域を検索し、ORF1-ORF2 ジャンクション領域上流約 1 Kb 付近に、新規 forward

primer を設計した。設計した新規 forward primer と、G1SKR または G2SKR を用いて RT-PCR を行い、約 1300~1000 bps の増幅産物を確認した。詳細は前年度報告書参照。

2. 第二世代プライマーデザインと RT-PCR

全長塩基配列のアライメントより、genome 5' 末端から約 3000 nt に 1st step PCR 用 forward primer、約 7400nt に reverse primer をデザインした。

<GI 1st step PCR 用プライマーセット>

UniKYFa GGBTGGGGHTTYTGGGT

UniKYFb GGWTGGGGGTTYTGGGT

GI-UniKYR GAHCCNGGDGGNGTNAMCCA

<GII 1st step PCR 用 primer set>

UniKYFa GGBTGGGGHTTYTGGGT

UniKYFb GGWTGGGGGTTYTGGGT

GII-UniKYR GCDANRAADGCHCCWGCCATTA

<GI nested PCR (2nd step PCR) 用 primer set

GI-UniKYFnest CCACNAARTCWGGYAAACAC

GI-UniKYRnest CCNAWDAYRGCTGRGCCATTAT

<GII nested PCR (2nd step PCR) 用 primer set>

GII- UniKYFnest GGNGNCARATGGGNATG

GII- UniKYRnest AADGCHCCWGCCATTA

上記プライマーセットと Hi fidelity PCR enzyme prime STAR GXL との組み合わせにより、約 3.2-4 Kbps の long distance RT-PCR を実現する。本 RT-PCR により増幅される領域は、1st step RT-PCR amplicon、2nd step amplicon 共に、完全長の polymerase region (RdRp) から Capsid N/S region をカバーし、ORF2 (VP1) 全長をカバーする。

3. 標準プラスミド

キメラウイルス検出、解析に対応する GI および、GII の標準プラスミドは、GI. 1 NV68 prototype Norwalk virus (accretion number; M87661) のゲノム全長塩基配列に点突然変異を導入して、pUC

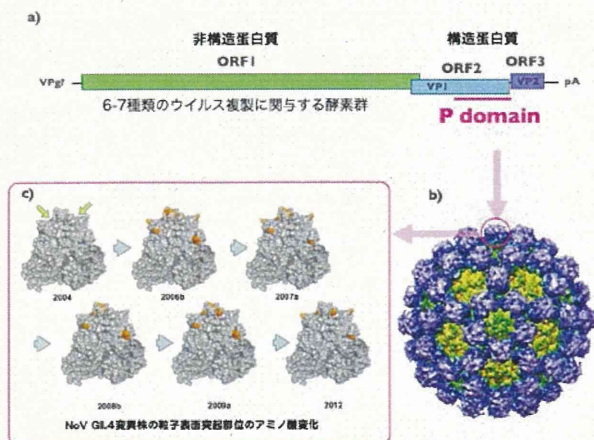
ベクターに組み込んだ pNV68Fmut と、GII.4 Sagal (accretion number; AB447456) のゲノム全長塩基配列に点突然変異を導入して同様に pUC ベクターに組み込んだ pGII4Sagalmut を作製して用いた。これらのプラスミドは、リアルタイム RT-PCR の標準物質としても利用可能である。

(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。組換え DNA 実験は全て国立感染症研究所の承認を得た上で実験計画に基づいて、認定施設内で実施した。

C. 研究結果、考察

新規に全長塩基配列を決定した GII/4 2012 変異株は、GII/4 2004 と比較して、全長に渡り変異が点在しており、相同性は 88% であった。ORF2 (VP1) 領域には、アミノ酸変異を伴う核酸変異が存在しており、図に示したように α 1-2 フコース結合部位 (緑色の矢印) の近傍に変異の集積が認められた。しかし、従来より広く用いられている genotyping 法や、コンベンショナルな RT-PCR, real-time PCR の primer probe のターゲット領域に変化はなかった。さらに、第一世代 genotyping primer, 新規にデザインした第二世代 genotyping primer にも影響はなかった。



HuNoV の GI, GII, GIV をすべてアライメントした場合、プライマーをデザイン可能な塩基配列の高度保存領域が見いだせなかったため、GI のみ、

GII のみをアライメントしたところ、genome 5' 末端から約 1000 nt-1200 nt, 4100nt - 4500 nt, 5100 nt - 5400 nt, 6400nt 近傍、genome end 近傍に比較的良好に塩基配列の保存された領域が存在することが明らかになった。さらに GI, GII に共通して TGGGTX のモチーフが 3000 付近に点在していることを見いだした。GII の場合も、ほぼ同様の位置に高度に塩基配列の保存された領域が存在した。

昨年度デザインした GI, GII それぞれの第一世代プライマーセットの検出率向上が図れなかったため、TGGGTX モチーフを利用した第二世代プライマーセットをデザインした。

HuNoV genome 3' end に存在する poly A tail をターゲットとした Tx30SXN primer と SuperScript version III を用いた逆転写反応により合成した cDNA を用いて、第二世代プライマーセットを用いた RT-PCR, 1st step, 2nd step を行った。その結果、 10^5 copies/g stool 以上の RNA titer があれば、テストした全ての遺伝子型で約 3.2kb の増幅産物が得られることが明らかになった。第二世代プライマーセットにより、第一世代に比べ、約 20% 程度の検出率向上が認められた。

コントロールとして用いた GI, GII それぞれのコントロールプラスミド、さらにそれらから T7 RNA polymerase を用いて、インビトロで合成した合成 RNA スタンダードを用いた検討では、検出感度が 10^1 ~ 10^2 copies/test tube であり、SK シリーズプライマーセットを用いたコンベンショナルな RT-PCR とほぼ同等の感度を有することが明らかになった。

第二世代プライマーセットは、2nd step PCR まで持ち込めば、SK シリーズを用いたコンベンショナルな RT-PCR とほぼ同等の感度を有することが明らかになった。また、1st step PCR amplicon は、これまで構築された様々な PCR 検出系の増幅領域をカバーしており、SK シリーズ amplicon を用いた従来の Capsid N/S 領域の genotyping, RdRp 領域を用いた genotyping, キメラウイルスの解析、genome 全長において最も多様性に富む VP1/P2 domain を用いた分子疫学にも対応できる。しかし、本研究結果は、代表的な genotype に対

する試験結果であり、GI, GII の混合感染事例、レアな genotype に対する検討を行うとともに、実用試験を重ねる必要があると思われた。第二世代プライマーもまた、genogroup IV を対象としていない。従って、本研究で新たに構築した検出システムでは、GIV は検出できない可能性が残っている。

D. 結論

本研究で、新たに 18 株の NoV 全塩基配列解析に成功した。18 株には、データベースに報告されていない NoV genotype, GI. 13, GI. 10, GI. 19, GII. 5, GII. 6, GII. 11, GII. 12, GII. 14, GII new genotype HK299, Yuzawa2011 が含まれている。これらの全長配列の解析により、全 GI, GII genotype クラスタの内、約 70% の全長配列が明らかにされた。本研究により、NoV のゲノム組み替えの解析に必要な、ORF1 にコードされる RdRp 領域の YGDD モチーフ上流の塩基配列のアライメントが可能となり、そこから Capsid N/S 領域の RT-PCR による増幅が可能となった。本研究により構築された、キメラウイルス解析に対応したプライマーセット、標準プラスミドを用いた分子疫学は、今後、新たなノロウイルスの分子疫学手法として広く普及することが期待される。

E. 研究発表

1. 片山和彦 日本医事新報 No4637 p60-61, 2013

G. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

(新聞) 指導、監修

1. 日経メディカル 2013 年 1 月号 p33「ノロウイルス変異株が猛威」

2. HOTERES2013 年 2 月 8 日号 p57-60 「猛威をふるったノロウイルスを検証」
3. 徳洲新聞 2013 年 1 月 14 日号 緊急特別企画 「ノロウイルス感染対策；今冬は過去 10 年で 2 番目の高水準 感染ピークは 12～1 月で警戒厳重に」
4. 日本経済新聞 2013 年 1 月 13 日号夕刊 7 面 「遺伝子変異、感染しやすく ノロウイルスなお警戒」
5. 朝日新聞 2012 年 11 月 27 日号夕刊 14 面 「ノロウイルス流行の兆し」
6. 毎日新聞 2012 年 12 月 8 日号夕刊 1 面 「ノロウイルス 06 年に次ぐ流行 変異型猛威」
7. 読売新聞 2012 年 12 月 15 日号夕刊 14 面 「ノロウイルス患者急増 感染研 遺伝子変異流行の恐れ」
8. 朝日新聞 2012 年 12 月 24 日 37 面 「ノロウイルス 院内 6 人死亡」

(テレビ放送) 出演、指導、監修

1. 2012 年 12 月 2 日 18 時 日本テレビ；パンキシャ！
2. 2012 年 12 月 4 日 11 時 TBS；ひるおび！
3. 2012 年 2 月 19 日 8 時 フジテレビ とくダネ！
4. 2012 年 2 月 19 日 14 時 フジテレビ 知りたがり！
5. 2012 年 12 月 21 日 8 時 テレビ朝日 モーニングバード！
6. 2012 年 12 月 21 日 22 時 NHK 情報 LIVE ただいま！
7. 2012 年 12 月 24 日 23 時 日本テレビ NEWS ZERO

(ラジオ番組) 出演

1. 2013 年 2 月 1 日 17 時 NHK ラジオ 私も一言。「ここに注目 感染性胃腸炎を起こすノロウイルスの正体」 片山和彦

平成 24 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」

研究分担報告

サポウイルス抗原検出系開発のための抗原パネルの作成

研究分担者	村上 耕介	国立感染症研究所	ウイルス第二部
研究協力者	岡 智一郎	国立感染症研究所	ウイルス第二部
	李 天成	国立感染症研究所	ウイルス第二部
	片岡 紀代	国立感染症研究所	感染病理部
	北元 憲利	兵庫県立大学	
	田中 智之	堺市衛生研究所	
	吉澄 志磨	北海道立衛生研究所	
	石田 勢津子	北海道立衛生研究所	
	原田 誠也	熊本県保健環境科学研究所	
	入谷 展弘	大阪市立環境科学研究所	
	飯塚 節子	島根県保健環境科学研究所	
	岩切 章	宮崎県衛生環境研究所	
	片山 和彦	国立感染症研究所	ウイルス第二部

研究要旨

サポウイルスはノロウイルスと同様、急性胃腸炎を引き起こす。近年、サポウイルスによる大規模な集団食中毒事例が報告されており、ノロウイルスと同等の検出体制の整備が求められる。サポウイルスの検出には主に核酸検出系が用いられており、精度、感度の改良が進められている。一方で、抗原抗体反応を用いた検出系の開発は遅れており、臨床検体からの迅速抗原検出系や、食品中のウイルス濃縮法の開発が重要課題となっている。本研究で我々は、サポウイルス特異抗体の作製とサポウイルスの抗原性評価に必要となる、サポウイルス様中空粒子 (virus-like particles: VLPs) の作製に取り組んだ。今年度は新たに 2 株のサポウイルス VLPs の作出に成功した。

A. 研究目的

サポウイルスは小型球形のノンエンベロープウイルスで、ノロウイルスと同様、乳幼児から高齢者まで年齢を問わず急性胃腸炎を引き起こす。核酸検出系を用い

た検討から、サポウイルスの核酸排泄量は 10^{6-11} copies/g stool と推測された。また、排出期間は、症状回復後 1、2 週間、最大で 1 か月程度続くとされ、ノロウイルスと同様の特徴を有する。近年開発さ

れた高精度なサポウイルス核酸検出系が導入され、サポウイルス急性胃腸炎は従来予想よりも高頻度に起きていることが明らかになった。サポウイルスの主な感染ルートはヒト-ヒト感染と考えられるが、サポウイルス汚染食材が原因と推察される大規模食中毒事例も報告されている。そのためノロウイルス同様、サポウイルス検出の重要性が増している。

サポウイルスのゲノムはプラス1本鎖のRNAで、構造タンパク質コード領域全長塩基配列を用いた解析により、少なくとも5つの遺伝子群(genogroup: GI, GII, GIII, GIV, GV)に分類される。またGI, GIIは、それぞれ7つの遺伝子型(genotype: GI.1-7, GII.1-7)に分類される [Oka et al, Arch Virol (2012) 157:349-352]。ヒトからはGI, GII, GIV, GVに属する合計16のgenotypeが検出されている。

ヒト由来のサポウイルスは培養細胞や実験動物での増殖系が確立されていない。そのため、サポウイルスの検出は主にreverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)法、リアルタイムRT-PCR法で行われる。一方で、迅速安価な検出法としてのサポウイルス抗原検出系、および、食品からのサポウイルス濃縮法の開発が求められており、そのために必要なサポウイルス特異抗体の作製は重要課題となっている。

サポウイルスのウイルス粒子は、1種類の構造タンパク質の180量体であると考えられている。構造タンパク質コード領域を発現させることで、ウイルスゲノムを持たないウイルス様中空粒子

(virus-like particles: VLPs)が作出される。VLPsは、患者糞便から検出されるサポウイルスと同じ形態を示し、同一の抗原性を示すと考えられている。

研究分担者が所属する研究室では昆虫細胞発現系、カイコ発現系(サナギ破砕液)、および哺乳動物細胞を用いて、合計16株のVLPsの作出に成功した(GI:3株、GII:9株、GIV:3株、GV:1株)。このうち6株(GI.1, GI.5, GII.2, GII.3, GIV, GV)のVLPsをウサギ、もしくはモルモットに免疫してポリクローナル抗体を作製した。この抗体を用いて抗原性を調べたところ、異なるgenogroup(GI, GII, GIV, GV)に属するサポウイルス株間では抗原性が異なることを明らかにした [Hansman et al, Emerg Infect Dis (2007) 13(10):1519-1525]。また、同じgenogroup内でも、異なるgenotypeに属する株間では抗原性が異なることを示した [Hansman et al, J Clin Microbiol (2007) 45(4):1347-1349; Oka et al, Microbiol Immunol (2009) 53(7):417-420]。

本研究班の北元憲利 兵庫県立大学教授、田中智之 堺市衛生研究所所長らによって、サポウイルスGI.1 Mc114株、GI.5 Yokote1株、GII.3 Syd53株、GIV Syd3株、GV NK24株VLPsを免疫抗原としたモノクローナル抗体が作製された。本研究班で作製に成功したVLPsも新たな免疫抗原、あるいは抗体の反応性評価に使用されており、高精度なサポウイルス抗原検出系構築に向けた有用なツールとなっている。本年度はさらに緻密なサポウイルスVLPsパネル作成を目指し、GIに属する2株のサポウイルスVLPsの作製を試みた。

B. 研究方法

1. 材料

6つの衛生研究所との共同研究によって国内の急性胃腸炎事例から検出されたサポウイルスのうち、GI.3、GI.7の2株を選択した。

2. サポウイルス VLPs 発現コンストラクトの作製

サポウイルス GI.3 OH08021 株 [AB623037]、GI.7 D1714 株 [AB522390] の構造タンパク質コード遺伝子の開始コドンからゲノム末端までの cDNA 領域 (約 2.3 kb) を Infusion Cloning kit (Clontech) により、バキュロウイルストランスファクター pVL1392 (Orbigen) のマルチクローニングサイト (Not I/Bam HI 間) にクローニングした。精製したプラスミドのシークエンスによって、得られたクローンがデータベース登録配列と一致することを確認した。

3. サポウイルス VLPs 発現用組換えバキュロウイルスの作製

8% FCS 添加 Grace medium を用いて培養した Sf9 細胞を 6 ウェルプレートに移し、培地を ExCell-405 (2 mL/ウェル) に置換した後、Lipofectin Reagent (Invitrogen) を用いて上記プラスミド (1-2 μ g) と BaculoGold (BD Bioscience) (0.5 μ g) を co-transfect した。一晩培養後、各ウェルに 8% FCS 添加 Grace medium 2 mL を加え、合計 4 mL/ウェルとし、さらに 7 日間培養した。

この培養上清を別途 8% FCS 添加 Grace medium を用いて T75 フラスコ 3 枚に培養した Sf9 細胞に添加し、さらに 7 日間培養した。この培養上清 (約 35 mL) を

VLPs 発現用組換えバキュロウイルスのシード (種) とした。調製したシードウイルス液は遮光し、4°C で保存した。

4. 昆虫細胞を用いたサポウイルス VLPs の発現

シードウイルス液を、T75 フラスコ 30 本に培養した Tn5 細胞に 1 mL ずつ添加し、7 日後に培養上清 (約 300 mL) を回収した。回収した培養上清を 4°C で 10,000 xg、60 分間遠心し、細胞破砕物およびバキュロウイルスを沈殿させた。その後、遠心上清を Sw32Ti ローター (Beckman Coulter) により、4°C で 32,000 rpm、3 時間、超遠心を行った。上清を除去後、遠心チューブにそれぞれ 300 μ L の ExpressFive SFM を加え、4°C で 1 晩静置した。その後、この溶液 (合計約 2 mL) を 4°C で 10,000 xg、30 分間遠心し沈殿残渣を除去し、上清を SW55Ti ローター (Beckman Coulter) により 4°C で 50,000 rpm、2 時間、超遠心を行った。上清を除去後、遠心チューブに各 100 μ L (合計約 200 μ L) の ExpressFive SFM を加え、4°C で一晩静置溶解後、4°C で 10,000 xg、5 分間遠心し沈殿残渣を除去した。MilliQ 水に 1.8 g の塩化セシウムを溶解し、VLPs 溶液を全量加え、合計約 5 mL とした後、Sw55Ti ローターを用いて 10°C で 35,000rpm、24 時間超遠心を行った。超遠心後、遠心チューブをライトで照らして観察されるバンドを 23G 注射針で抜き出した。抜き出した溶液を ExpressFive SFM で 5 倍以上に希釈し、SW55Ti ローターを用いて 4°C で 50,000 rpm、2 時間、超遠心を行った。上清を除去後、各遠心チューブに ExpressFive SFM を 100-200 μ l 加え、4°C で一晩静置した。

得られた溶液を電子顕微鏡で観察して VLPs の作出を確認した。また SDS-PAGE/CBB 染色を行うことで濃度を調べた。

(倫理面への配慮)

本研究では、特定の研究対象者が存在せず、倫理面への配慮は不要である。組換え DNA 実験は全て国立感染症研究所の承認を得た上で実験計画に基づいて、認定施設内で実施した。

C. 研究結果

サポウイルス 2 株 (GI. 3、GI. 7) について VLPs 発現コンストラクトおよびシード組換えバキュロウイルスを作製した。この組換えバキュロウイルスを用いて VLPs の発現を試み、いずれも発現に成功した。電子顕微鏡観察により、これらの VLPs はサポウイルスに特徴的な形態を有していた。VLPs の収量は T75 フラスコ 30 枚 (培養上清 約 300 mL) あたり、GI. 3 OH0821 株が 18 µg、GI. 7 D1714 株が 4 µg であった。

D. 考察

昨年度までは、Tn5 の培養に Ex-Cell 405 (Invitrogen) を使用していたが、本年度は ExpressFive SFM (Invitrogen) を使用した。しかし VLPs の発現量は改善されなかったことから、いずれの培地を使用しても差がないと示唆された。一方で、昨年度までの研究から、株ごとに発現量が異なる可能性が示唆されており、D1714 株の発現量は元々低いと考えられた。

本研究班の北元憲利教授の研究から、

これまでに発現に成功した各株の VLPs に対して反応性を持つブロードなモノクローナル抗体が得られていることから、各 genogroup、genotype に対応する特異抗体を作製せずとも高精度のサポウイルス抗原検出系を構築できる可能性が示唆されている。そのため、今回作製した VLPs に対する反応性を評価する必要がある。

サポウイルスは、ノロウイルスと比較して VLPs の収量が少なくとも 1/10 程度低いことから、VLPs の大量発現系の確立という課題は残っている。しかし、このような取り組みを継続的に行うことで、サポウイルス抗原の迅速検出系、および、食品からのサポウイルス濃縮法の開発が促進されることが期待された。

E. 結論

GI. 3 の D1714 株、GI. 7 の OH0821 株の VLPs を作出することに成功した。このことで、サポウイルス VLPs パネルの約 7 割をカバーすることができた。継続的に取り組むことで、実用的なサポウイルス抗原の迅速検出系、食品からのサポウイルス濃縮法の開発が促進される可能性が考えられた。

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

平成 24 年度厚生労働科学研究費補助金(食品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

日本における 2012 年の A 型肝炎の分子疫学的解析

研究分担者 石井孝司 (国立感染症研究所ウイルス第二部・室長)

共同研究者 野田 衛 (国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部・室長)

研究要旨：日本での A 型肝炎患者数は 2007 年以降非常に低いレベル (150 人/年程度) で推移していたが、2010 年は 3 月から全国各地で A 型肝炎が多発し、最終的には年間 342 人の患者発生を見た。本研究では、2010 年、2011 年に引き続き全国の地方衛生研究所と共同で、A 型肝炎患者の糞便または血清から A 型肝炎ウイルス(HAV) ゲノムの配列を決定し、流行状況を分子疫学的に解析した。2010 年の流行の主要な原因となった、東南アジア由来と考えられる株による発生は 2012 年には見られなかった。また、genotype IIIA については 2010 年、2011 年に引き続き検出されている。

A. 研究目的

日本での A 型肝炎患者数は 2007 年以降非常に低いレベル (150 人/年程度) で推移していたが、2010 年は 3 月から全国各地で A 型肝炎が多発し、2010 年の A 型肝炎患者数は最終的には 342 人に達した。我々は、感染症情報センター、国立医薬品食品衛生研究所、および全国の地方衛生研究所と共同で、A 型肝炎の全国的なサーベイランスシステムを構築し、ウイルス(HAV)ゲノムの塩基配列情報を基に分子疫学的な解析を行っている。本年は、昨年に引き続き 2012 年の A 型肝炎の日本における発生状況について分子疫学的解析を行い、流行状況の調査を行った。

B. 研究方法

A 型肝炎患者の便乳剤または血清から RNA を抽出し、平成 21 年 12 月 1 日に医薬食品局食品安全部監視安全課長より通知された食安監発 1201 第 1 号「A 型肝炎ウイルスの検出法について」に従い、HAV ゲノムの構造/非構造領域の junction 部分の配列を RT-PCR 法により増幅後決定した。これらの配列を過去のデータベースと比較し分子疫学的な解析を行なった。

倫理面への配慮：取り扱うすべての DNA および病原性微生物に関しては適切な封じ込めレベルの実験施設で取り扱われる。各種研究材料の取り扱い及び組換え DNA 実験は、適切な申請を行い承認を受ける。

C. 研究結果

2012 年は現在までに 28 株の解析を行った。IA が 21 株、IB が 2 株、IIIA が 4 株、IIIB が 1 株であった。図に赤で示したのが本年に検出された株である。

野田市で発生した家族内感染では 6 人が発症している。日本に常在する IA 株 (IA-1) によると考えられる。

2010 年に diffuse outbreak の主な原因となった東南アジア由来と考えられる株(IA-2)は、2011 年には静岡県で 1 例報告されたのみ (他に類似配列が佐賀県で 2 例報告されている) で、2012 年上期には見つかっていないことから、日本に定着せずにはほぼ消失したものと考えられる。

D. 考察

2010 年の全国的な diffuse outbreak の主な原因となった IA-2 のクラスターに属する株は、2012 年には全く検出されなかった。このクラスターに属する株は同一の感染源から何らかの理由で 2010 年に全国に拡散して広域流行をおこしたが、二次的な拡大はせずに収束し、2011 年にはほぼ消失したものと推定される。

Genotype IIIA は今年も検出されており、引き続き注意が必要と考えられる。IIIB は昨年は宮城県で 1 株、今年には北海道で 1 株が検出された。また、11 月にエジプトツアー客 2 名が急性 A 型肝炎を発症し、配列が解析できた 1 名の genotype は IB であった。

E. 結論

2010 年の流行の主な原因となった株 (IA-2) は 2011 年にはほとんど見られず、日本には定着せずには消失した可能性が示唆されるが、引き続き注意を払う必要がある。IIIA は 2012 年も検出されており、日本への定着が懸念される。

ウイルスの分子疫学的な解析は流行状況把握の上で有用であり、今後もこのようなサーベイランスシステムを継続していくことは極めて重要であ

ると考えられる。

全国サーベイランス共同研究者

清原知子、吉崎佐矢香、佐藤知子、島田智恵、中村奈緒美、中島一敏、多田有希（国立感染症研究所）

上間 匡（国立医薬品食品衛生研究所）

筒井理華（青森県）青木洋子（山形県）関根雅夫（仙台市）齊藤哲也（新潟市）原 孝（茨城県）山崎彰美（柏市）篠原美千代（埼玉県）新開敬行（東京都）涌井 拓（千葉県）清水英明（川崎市）宇宿秀三（横浜市）大沼正行（山梨県）長岡宏美（静岡県）吉田徹也（長野県）岡村雄一郎（長野市）小原真弓（富山県）柴田伸一郎（名古屋市）楠原 一（三重県）近野真由美（京都市）入谷展弘（大阪市）飯島義雄（神戸市）川西伸也（姫路市）榊原啓子（岡山市）榎本義正（福山市）岡本玲子（山口県）世良暢之（福岡県）川本大輔（福岡市）増本久人（佐賀県）上村晃秀（鹿児島県）

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kanda T., Wu S., Kiyohara T., Nakamoto S., Jiang X., Miyamura T., Imazeki F., Ishii K., Wakita T. and Yokosuka O. Interleukin 29 suppresses hepatitis A and C viral internal ribosomal entry site-mediated translation. *Viral Immunology*, 25: 379-386 (2012)
2. Kubota T., Kumagai A., Ito H., Furukawa S., Ishii K., Wakita T., Takeda N., Someya Y., Narimatsu H. and Shirato H. Structural basis for the recognition of Lewin antigens by genogroup I norovirus. *Journal of Virology*, 86: 11138-11150 (2012)
3. Tominaga A., Kanda T., Akiie T., Komoda H., Ito K., Abe A., Aruga A., Kaneda S., Saito M., Kiyohara T., Wakita T., Ishii K., Yokosuka O. and Sugiura N. Hepatitis A outbreak associated with a revolving sushi bar in Chiba, Japan: application of molecular epidemiology. *Hepatology Research*, 42: 828-834 (2012)
4. Ishii K., Miyamura T., Kanda T., Tawada A., Sekimoto T., Wu S., Nakamoto S., Arai M., Fujiwara K., Imazeki F., Kiyohara T., Wakita T. and Yokosuka O. Possible widespread presence of hepatitis A virus subgenotype IIIA in Japan: recent trend of hepatitis A causing acute liver failure. *Hepatology Research*, 42: 248-253 (2012)
5. Ishii K., Li T.C., Yoshizaki S., Shiota T., Kato T., Takeda N. and Wakita T. Cloning of permissive and nonpermissive human hepatoma cell lines for hepatitis E virus infection. *Hepatology International*. 6: 292 (2012)
6. Ishii K., Kiyohara T., Yoshizaki S., Wakita T., Shimada T., Nakamura N., Nakashima K., Tada Y. and Noda M. Epidemiological and genetic

analyses of a diffuse outbreak of hepatitis A in Japan, 2010. *Journal of Clinical Virology*, 53, 219-224 (2012)

7. 石井孝司、清原知子 A 型肝炎ワクチン *BIO Clinica* 28: 25-29 (2013)
 8. 石井孝司、脇田隆字 海外における A 型肝炎集団発生 -わが国への警鐘- 化学療法の領域 28: 984-992 (2012)
 9. 石井孝司 2010 年春季の A 型肝炎の diffuse outbreak の分子疫学的解析 *消化器内科* 54: 233-238 (2012)
- ### 2. 学会発表
1. Kubota T., Kumagai A., Ito H., Furukawa S., Someya Y., Ishii K., Wakita T., Takeda N., Shirato H. and Narimatsu H. X-ray crystallographic studies on binding specificity of norovirus to Lewis antigens. 4th Asian Communications of Glycobiology and Glycotechnology. Jeju, Korea, October 28-31, 2012
 2. Ishii K., Kanda T., Sugiura N., Kiyohara T., Yoshizaki S., Nakamura N., Shimada T., Nakashima K., Tada Y., Yokosuka O., Wakita T. and Noda M. Epidemiological and genetic analysis of hepatitis A between 2010 and 2011 in Japan. 14th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Diseases. Shanghai, China. June 22-25, 2012
 3. Li T.C., Yoshimatsu K., Yasuda S., Arikawa J., Kataoka M., Ami Y., Suzaki Y., Ishii K., Takeda N. and Wakita T. Antigenicity and infectivity of rat hepatitis E virus. The 9th Japan-China International Conference of Virology. Sapporo, Japan, June 12-13, 2012
 4. Ishii K., Li T.C., Yoshizaki S., Shiota T., Kato T., Takeda N. and Wakita T. Cloning of permissive and nonpermissive human hepatoma cell lines for hepatitis E virus infection. Asian Pacific Association for the Study of the Liver. Taipei, Taiwan, February 16-19, 2012.
 5. 清原知子、脇田隆字、石井孝司 : B 型肝炎ワクチン力価測定法の比較 : 第 16 回日本ワクチン学会、平成 24 年 11 月、横浜
 6. 原田誠也、西村浩一、李 天成、石井孝司、田中智之、野田 衛 : 熊本県におけるイノシシ、シカ及びブタの E 型肝炎ウイルス汚染実態調査と分子疫学的解析 : 第 60 回日本ウイルス学会、平成 24 年 11 月、大阪
 7. 横川 寛、森山正樹、赤澤大輔、中村紀子、石井孝司、加藤孝宣、脇田隆字 : イオン交換クロマトグラフィーを用いた C 型肝炎ウイルス粒子精製の検討、第 60 回日本ウイルス学会、平成 24 年 11 月、大阪
 8. 塩田智之、李 天成、吉崎佐矢香、武田直和、脇田隆字、石井孝司 : E 型肝炎ウイルス生活環におけるカプシド蛋白 C 末端 52 アミノ酸の

機能解析、第60回日本ウイルス学会、平成
24年11月、大阪

9. 清原知子、Niroshana Dahanayaka、脇田隆
字、石井孝司：スリランカにおけるA型肝炎
の流行（2009-2010年）、第16回日本渡航
医学会、平成24年7月、大阪

G. 知的所有権の取得状況
なし

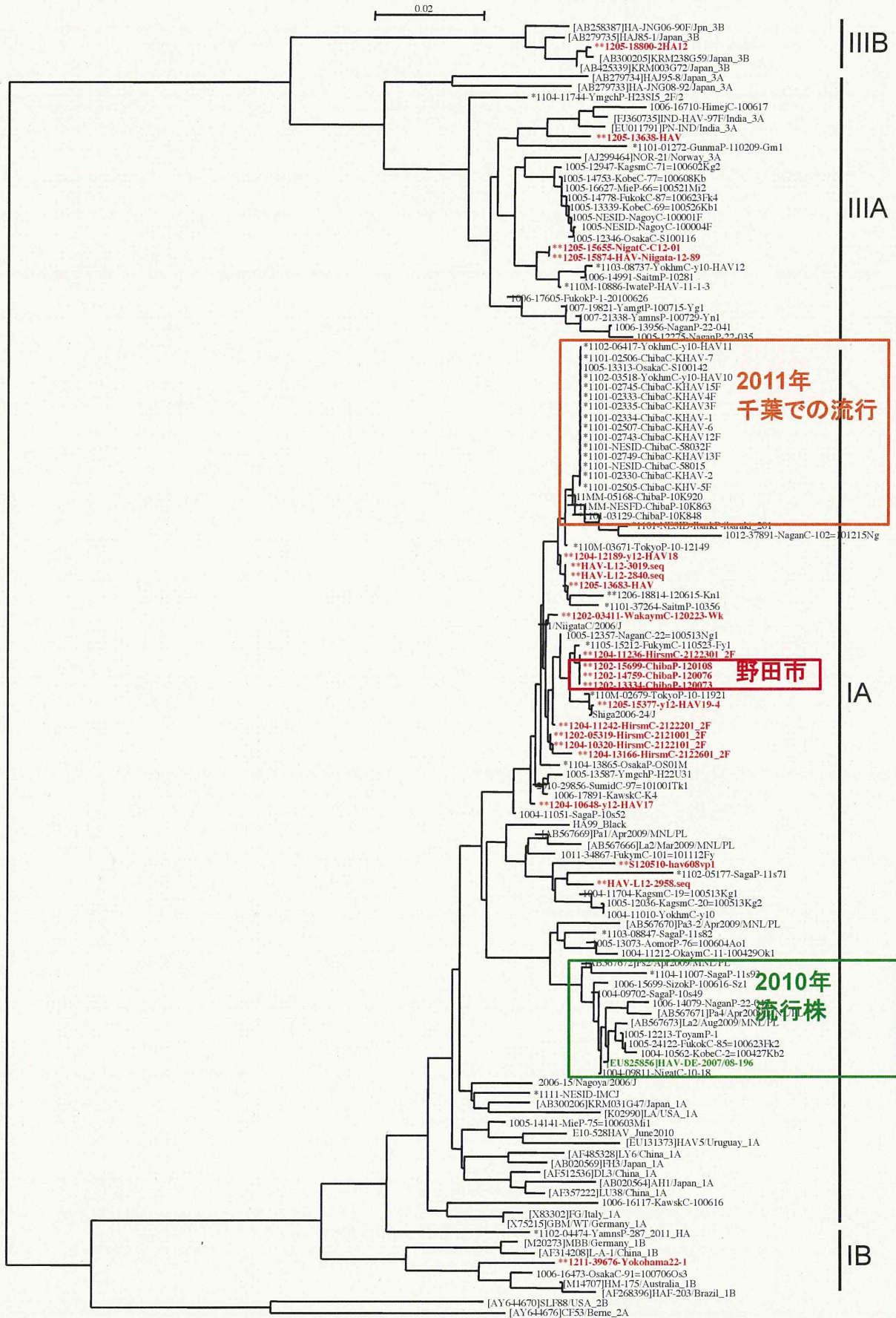


図 2012年に検出されたA型肝炎ウイルスの系統樹解析結果

E 型肝炎ウイルスに対するラットの感受性

研究分担者	李 天成	国立感染症研究所
研究協力者	吉崎 佐矢香	国立感染症研究所
	脇田 隆宇	国立感染症研究所
	網 康至	国立感染症研究所
	須 崎百合子	国立感染症研究所

研究要旨

E 型肝炎ウイルス (HEV) は E 型肝炎の原因ウイルスである。E 型肝炎は発展途上国で常に発生し、先進国においても、輸入感染症だけではなく、人畜共通感染症として注目されている。現在、多種の野生動物から HEV 抗体が検出されているが、遺伝子レベルで HEV の感染が確認されたのは極一部の動物である。Rat HEV は野生ラットから分離され、遺伝子構造上ヒト HEV と類似するウイルスであり、その病原性やヒトへの感染性などに関する情報が少ない。一方、野生ラットから抗 HEV 抗体が検出されているにもかかわらず、ヒト HEV に対するラットの感受性も明らかではない。本研究ではヒト HEV、rat HEV をラットに接種し、ウイルスの増殖の有無を ELISA 法および RT-PCR 法を用いて評価した。その結果、ラットは rat HEV に対しては感受性を有するがヒト由来 HEV に対しては感受性を持たないことが明らかになった。

A. 研究目的

E 型肝炎ウイルス (HEV) は E 型肝炎の原因ウイルスである。E 型肝炎は発展途上国で常に発生し、先進国においても、輸入感染症だけではなく、人畜共通感染症として注目されている。現在、多種の野生動物から HEV 抗体が検出されているが、遺伝子レベルで HEV の感染が確認されたのは極一部の動物である。Rat HEV は野生ラットから分離された遺伝子構造上ではヒト HEV と類似するウイルスであり、そ

の病原性やヒトへの感染性などに関する情報が少ない。一方、野生ラットから抗 HEV 抗体が検出されているにもかかわらず、ヒト HEV に対するラットの感受性も明らかではない。本実験はヒト HEV、rat HEV に対するラットの感受性を感染実験で確認することを目的とする。

B. 研究方法

Genotype 1, 3, 4 (G1, G3, G4) HEV および rat HEV をラット尾静脈内から接種し、

経時的に採血と採便を行った。ウイルス遺伝子、抗体、ALT/ASTを測定してウイルスの感染の有無を評価した。Rat HEVの感染ルートを同定するため、rat HEVに汚染されたケージで一週間飼育した後、rat HEV汚染されないケージに移して観察した。観察期間は3ヶ月間である。

(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。

C. 研究結果

G1, G3, G4 HEVを接種したラットから抗HEV IgG、IgM抗体およびHEV RNAが検出されず、ALTの上昇も見られなかった。この結果からラットはHEVに対する感受性を有しないことが推測された。Rat HEVを接種したラットでは接種後三週目から抗rat HEV IgGとIgM抗体が検出され、便中からrat HEV RNAが検出された。この結果によりrat HEVはラットに感染することが証明された。さらに、rat HEVに汚染されたケージで飼育されたラットから抗rat HEV抗体及びrat HEV RNAが検出され、rat HEVは糞口ルートによって伝播することが明らかになった。しかし、すべてのrat HEV感染ラットではALTの上昇が認められなかったことからrat HEVは肝炎を引き起こさないことが推測された。

D. 考察

長い間、ラットはHEVの宿主ではないかと疑われたが、確かな証拠がなかなか見つからなかった。今回我々は、ラット

を用いた感染実験により、ヒト由来G1, G3およびG4HEVがラットに感染しないことを明らかにした。この結果はHEV感染対策上非常に有意義である。

E. 結論

Rat HEVはラットに感染するが、ヒト由来HEVはラットに感染しない。

F. 研究発表

1. 論文発表

1). Li TC, Yoshizaki S, Ami Y, Suzaki Y, Yasuda SP, Yoshimatsu K, Arikawa J, Takeda N, Wakita T. Article title: Susceptibility of laboratory rats against genotypes 1, 3, 4, and rat hepatitis E viruses. *Vet Microbiol.* 2013, 163:54-61.

2). Tian-Cheng Li, Yasushi Ami, Yuriko Suzaki, Shumpei P. Yasuda, Kumiko Yoshimatsu, Jiro Arikawa, Naokazu Takeda, and Wakita Takaji. Full-Genome Characterization of a Rat Hepatitis E Virus Strain Isolated in Vietnam. *EID.* 2013 Jan;19(1):115-8.

3). Hiroshi Yamamoto, Juri Suzuki, Atsushi Matsuda, Takafumi Ishida, Yasushi Ami, Yuriko Suzaki, Adachi Isao, Takaji Wakita, Naokazu Takeda, and Tian-Cheng Li Hepatitis E Outbreak in Monkey Facility, Japan. *EID* 2012, 18 (12) 2032-2034.

4). Koma T, Yoshimatsu K, Yasuda SP, Li

Li TC, Amada T, Shimizu K, Isozumi R, Mai LT, Hoa NT, Nguyen V, Yamashiro T, Hasebe F, Arikawa J. A survey of rodent-borne pathogens carried by wild *Rattus* spp. in Northern Vietnam. *Epidemiology and Infection*. Epidemiol Infect. 2012 Nov 1:1-9.

5). Kitamoto N, Oka T, Katayama K, Li TC, Takeda N, Kato Y, Miyoshi T, Tanaka T. Novel monoclonal antibodies broadly reactive to human recombinant sapovirus-like particles. *Microbiol Immunol*. 2012 Nov;56 (11):760-770.

6). Jariyapong P, Xing L, van Houten NE, Li TC, Weerachatanukul W, Hsieh B, Moscoso CG, Chen CC, Niikura M, Cheng RH. Chimeric hepatitis E virus-like particle as a carrier for oral-delivery. *Vaccine*. 2012 Oct 26. (12) 01533-2.

7). Ishii K., Li T.C., Yoshizaki S., Shiota T., Kato T., Takeda N. and Wakita T. Cloning of permissive and nonpermissive human hepatoma cell lines for hepatitis E virus infection. *Hepatology International*. 6: 292 (2012)

8). Tian-Cheng Li, Susumu Ochiai, Hiroaki Ishiko, Takaji Wakita, Tatsuo Miyamura and Naokazu Takeda. A retrospective study on imported hepatitis E in Japan. *Travel Med Infect Dis*. 2012 ;10(2):80-5.

2. 学会発表

1). 李 天成、片岡 紀代、網 康至、須崎 百合子、安田 俊平、吉松 組子、有川 二郎、武田 直和、脇田 隆字。ラット E 型肝炎ウイルス様粒子の作製および粒子形成に必要な領域の同定。第 60 回日本ウイルス学会学術集会 2012 年 11 月 大阪。

2). 塩田 智之、李 天成、吉崎 佐矢香、武田 直和、脇田 隆字、石井 孝司。E 型肝炎ウイルス生活環にカプシド蛋白 C 末端 52 アミノ酸の機能解析。第 60 回日本ウイルス学会学術集会 2012 年 11 月大阪。

3). 田中聖一、山本 博、万年 和明、李天成。ニホンザルにおける E 型肝炎ウイルス感染状況。第 60 回日本ウイルス学会学術集会 2012 年 11 月 大阪。

4). 原田 誠也、西村浩一、李 天成、石井孝司、田中智之、野田衛。熊本県におけるイノシシ、シカおよびブタの E 型肝炎ウイルス汚染実態調査と分子疫学解析。第 60 回日本ウイルス学会学術集会 2012 年 11 月大阪。

5). 李 天成、安田 俊平、吉松 組子、片岡 紀代、吉崎 佐矢香、網 康至、須崎百合子、有川 二郎、武田 直和、脇田隆字。E 型肝炎ウイルスに対するラットの感受性。第 154 回日本獣医学会学術集会 2012 年 9 月 岩手。

6). 清水健太郎、李 天成、安田 俊平、吉松 組子、駒 貴明、長谷部 太、山本哲、有川 二郎。ベトナムのラットおよびヒトにおけるラット E 型肝炎ウイルスの感染状況の調査。第 154 回日本獣医学会学術集会 2012 年 9 月 岩手。

7). Tian-Cheng Li, kumiko Yoshimatsu, Shumpei P. Yasuda, Jiro Arikawa, Yasushi Ami³, Yuriko Suzaki and Takaji Wakita. Characterizations of the infectivity of genotype 1, 3, 4 and rat hepatitis E viruses in laboratory rats. 14th international Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease (14th ISVHLD). June 22-25, 2012 China

Shanghai.

8). Tian-Cheng Li, Kumiko Yoshimatsu, Shumpei P. Yasuda, Jiro Arikawa, Michiyo Kataoka, Yasushi Ami, Yuriko Suzaki, Koji Ishii, Naokazu Takeda and Takaji Wakita. Antigenicity and infectivity of rat hepatitis E viruses. 第 9 回日中国際ウイルス学会. Jun 12-13. 2012. Sapporo.

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

平成 24 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」
研究分担報告書

パンソルビントラップ法の多機関評価試験結果

研究分担者	野田 衛	(国立医薬品食品衛生研究所・食品衛生管理部)
研究協力者	斎藤 博之	(秋田県健康環境センター)
	筒井 理華	(青森県環境保健センター)
	小和田和誠	(福井県衛生環境研究センター)
	入谷 展弘	(大阪市立環境科学研究所)
	内野 清子	(堺市衛生研究所)
	溝口 嘉範	(岡山県環境保健センター)
	飯塚 節子	(島根県保健環境科学研究所)
	山下 育孝	(愛媛県立衛生環境研究所)
	世良 暢之	(福岡県保健環境研究所)
	原田 誠也	(熊本県保健環境科学研究所)
	岩切 章	(宮崎県衛生環境研究所)
	上間 匡	(国立医薬品食品衛生研究所・食品衛生管理部)

研究要旨： 一般食品からの簡便、迅速なウイルス検出法として開発されたパンソルビントラップ法について、ノロウイルス GII/4 を汚染させたきな粉を汚染食品として 11 機関による評価試験を実施した。検査法の開発を行った機関を除き、他の 10 機関の検査結果は必ずしも満足できる結果ではなく、特にリアルタイム PCR 法の検出率が低い傾向にあった。DNase 処理を省き逆転写反応を厚生労働省の通知法に準じた方法に変更し、またリアルタイム PCR に使用するマスターミックス液を変更し、再試験を実施した結果、多くの検査機関で検査結果の改善が認められた。本法は、得られた RNA の逆転写反応およびリアルタイム PCR の試薬等に影響を受けることから、各検査機関で本法を導入するためには、検出感度や試薬の有効性の確認等を実施する必要があると思われた。また、リアルタイム PCR の定量値が各検査機関で大きくばらついたことから、その精度管理の必要性が示唆された。

A. 研究目的

一般的な食品からの検出法として開発されたパンソルビントラップ法について

多機関による評価試験を実施し、検査機関間のバラつき、問題点等の把握を行い、必要に応じて検査法の改良を行うことを

目的とする。

B. 研究方法

1. 多機関評価試験の概要

国立医薬品食品衛生研究所(国立衛研)でノロウイルス GII 汚染食品を作製し、研究協力を得た 11 地方衛生研究所(地研)に試験品等を配布した後、食品のウイルス標準試験法検討委員会作業部会案を基本とした共通の試験法に従い、国立衛研から配布した試薬等を用いて、食品からのウイルスの濃縮から逆転写反応まで実施した。その後、各検査機関が所有する試薬等を用いて、各検査機関が通常実施している方法に従い、リアルタイム PCR, nested PCR, および nested リアルタイム PCR を実施した。nested PCR では電気泳動後、増幅 DNA が確認された検体について、増幅産物が少ない検体から検査して少なくとも 2 検体の増幅 DNA がノロウイルス由来であることを確認した。検査終了後、検査結果および検査実施状況について各機関から国立衛研に連絡後、国立衛研で集計分析した。

多機関評価試験の結果、検査法に問題点が認められたため、プロトコールの変更を行い、研究協力が得られた 8 地研で再度試験を実施した。

2. 汚染食品の作製

汚染食品には市販のきな粉を用いた。保存していたノロウイルス GII/4 陽性糞便遠心上清を 10% ビーフ・エキストラクト加イーグル MEM 培地で $1.7 \times 10^5 / 50 \mu\text{l}$ (高濃度ウイルス液), $1.7 \times 10^3 / 50 \mu\text{l}$ (低濃度ウイルス液) に希釈したものを接種ウイルス液とした。1~9 の番号を付した

滅菌ポリ袋にきな粉を 5g ずつ分注(117 検体作製)後、接種ウイルス液 $50 \mu\text{l}$ を接種(食品 1g あたりの汚染量: 高濃度液 3.4×10^4 , 低濃度 3.4×10^2)し、その後全ての検体に食品洗滌液 (0.1M Tris・HCl - 0.5M NaCl - 0.1% Tween20 (pH8.4)) 10ml を加え、全体が湿るまでよく揉んだ後、滅菌ポリ袋をシールした(高濃度ウイルス液 39 袋(No. 2, 6, 8), 低濃度ウイルス液 39 袋(No. 3, 4, 7), 未接種 39 袋(No. 1, 5, 9))。

3. 検体の送付

各検査機関には、食品 9 検体(高濃度汚染食品 3 検体, 低濃度汚染食品 3 検体, 未接種食品 3 検体), 接種ウイルス液(高濃度ウイルス液および低濃度ウイルス液各ウイルス液 $50 \mu\text{l}$ に PBS(-) $90 \mu\text{l}$ を加えたもの, およびそれを QIAamp Viral RNA Mini Kit(QIAGEN)に添付された AVL バッファー(キャリア RNA 添付済) $560 \mu\text{l}$ に溶解したもの計 4 検体), ノロウイルス GII cDNA ($5 \mu\text{l}$ を鋳型 DNA にした時, 10^5 となるもの(基準 DNA), 温度記録計を, 感染性物質運搬用のジュラルミンケースに入れ, 保冷下で郵送した。

4. 各検査機関における検査の実施

添付資料 2 に示した「パンソルビントラップ法評価のためのコラボ研究: 操作法および検査実施記録書」に従い、各検査機関において評価試験を実施した。

5. 結果の集計

検査結果および検査実施記録については、専用のエクセルファイルに記入後、国立衛研に送付し、国立衛研において集計した。

6. 再試験の実施