

検査機関ID	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
--------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

鋳型DNA量と反応液量

1st PCR

鋳型DNA量	5 μ l	5 μ l	5 μ l	2 μ l	2.5 μ l	5 μ l	2.5 μ l	5 μ l	5 μ l	2.5 μ l	3 μ l
反応液量	25 μ l	25 μ l	50 μ l	20 μ l	25 μ l	50 μ l	25 μ l	50 μ l	25 μ l	22.5 μ l	27 μ l

Semi-nested PCR

鋳型DNA量	0.05 μ l	1 μ l	1 μ l	2 μ l	2.5 μ l	2 μ l	2.5 μ l	1 μ l	5 μ l	1 μ l	2 μ l
反応液量	25 μ l	25 μ l	50 μ l	40 μ l	25 μ l	50 μ l	25 μ l	50 μ l	25 μ l	24 μ l	48 μ l

反応条件

1st PCR	94°C:4分⇒ (94°C:30秒⇒ 55°C~51°C: 30秒⇒72°C: 30秒)*×5回 ⇒(94°C:30秒 ⇒50°C:30秒 ⇒72°C:30秒) ×40回⇒ 72°C:7分⇒ 4°C保存,*タッ チダウンPCR (Δ -1°C /cycle)	(95°C:10秒⇒ 50°C:20秒⇒ 72°C:30秒)× 40回⇒72°C:5 分⇒10°C保存	(95°C:1分⇒ 55°C:1分⇒ 72°C:1分)× 40回⇒4°C保 存	95°C:5分⇒ (95°C:1分⇒ 45°C:2分⇒ 60°C:4分)×5 回⇒(95°C:30 秒⇒50°C:30 秒⇒72°C:1 分)×35回⇒ 72°C:5分⇒ 4°C保存	(95°C:30秒⇒ 50°C:1秒⇒ 72°C:1分)× 40回⇒72°C: 10分⇒4°C保 存	(95°C:30秒⇒ 50°C:1秒⇒ 72°C:1分)× 40回⇒72°C: 10分⇒4°C保 存	(95°C:30秒⇒ 50°C:1秒⇒ 72°C:1分)× 35回⇒72°C: 10分⇒4°C保 存	95°C:3分⇒ (95°C:30秒⇒ 52°C:30秒⇒ 72°C:1分)× 40回⇒72°C:5 分⇒4°C保存	94°C:3分⇒ (94°C:1分⇒ 50°C:1分⇒ 72°C:2分)× 40回⇒72°C: 15分⇒4°C保 存	94°C:3分⇒ (94°C:1分⇒ 50°C:1分⇒ 72°C:2分)× 40回⇒72°C: 15分⇒4°C保 存	94°C:3分⇒ (94°C:1分⇒ 50°C:1分⇒ 72°C:1分)× 40回⇒72°C: 15分⇒4°C保 存
Semi-nested PCR	94°C:4分⇒ (94°C:30秒⇒ 55°C~51°C: 30秒⇒72°C: 30秒)*×5回 ⇒(94°C:30秒 ⇒50°C:30秒 ⇒72°C:30秒) ×40回⇒ 72°C:7分⇒ 4°C保存,*タッ チダウンPCR (Δ -1°C /cycle)	(95°C:10秒⇒ 50°C:20秒⇒ 72°C:30秒)× 35回⇒72°C:5 分⇒10°C保存	(95°C:1分⇒ 55°C:1分⇒ 72°C:1分)× 40回⇒4°C保 存	95°C:5分⇒ (95°C:30秒⇒ 50°C:30秒⇒ 72°C:30秒)× 40回⇒72°C:7 分⇒4°C保存	(95°C:30秒⇒ 50°C:1秒⇒ 72°C:1分)× 35回⇒72°C: 10分⇒4°C保 存	(95°C:30秒⇒ 50°C:1秒⇒ 72°C:1分)× 35回⇒72°C: 10分⇒4°C保 存	(95°C:30秒⇒ 50°C:1秒⇒ 72°C:1分)× 35回⇒72°C: 10分⇒4°C保 存	95°C:3分⇒ (95°C:30秒⇒ 52°C:30秒⇒ 72°C:1分)× 40回⇒72°C:5 分⇒4°C保存	94°C:3分⇒ (94°C:1分⇒ 50°C:1分⇒ 72°C:2分)× 40回⇒72°C: 15分⇒4°C保 存	94°C:3分⇒ (94°C:1分⇒ 50°C:1分⇒ 72°C:2分)× 30回⇒72°C: 15分⇒4°C保 存	94°C:3分⇒ (94°C:1分⇒ 50°C:1分⇒ 72°C:1分)× 35回⇒72°C: 15分⇒4°C保 存

検査機関ID	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
使用プライマー											
1st PCR											
F-primer	COG2F	COG2F	COG2F	COG2F	COG2F	COG2F,ALPF	COG2F	COG2F	COG2F	COG2F	COG2F
R-primer	G2SKR	G2SKR	G2SKR	G2SKR	G2SKR	G2SKR, G2ALSKR	G2SKR	G2SKR	G2SKR	G2SKR	G2SKR
Semi-nested PCR											
F-primer	G2SKF	G2SKF	G2SKF	G2SKF	G2SKF	G2SKF	G2SKF	G2SKF	G2SKF	G2SKF	G2SKF
R-primer	G2SKR	G2SKR	G2SKR	G2SKR	G2SKR	G2SKR, G2ALSKR	G2SKR	G2SKR	G2SKR	G2SKR	G2SKR

資料 2

パンス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

本書に記載した検査実施記録は、最終的には検査結果とともに別添のエクセルファイルに記入して、提出してください。

1. 検体の受領と保管

試験品等を受け取ったら、受け取りの日時と保存状態を確認してください。

受け取った当日または翌日に検査する場合は食品検体等を試験時まで 4℃で保管してください。それ以降に検査を実施する場合は、-30℃以下に保存し、試験時は 37℃温浴等につけて速やかに解凍してください。

カードロガーは、そのまま(電源を OFF にする必要はありません)、添付のプチプチで包装して、返信用封筒に入れて、国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部野田に返送してください。

検体受領日時	平成 年 月 日 (午前・午後) 時 分
検体の状態	(良好・問題あり) 問題ありの場合は具体的に記入
検査の実施	(当日・後日)検査を実施 後日の場合は検査実施までの保存条件 ()° に保存

2. 必要な器具・試薬

1) 器具

マイクロピペットおよびチップ(1000 μ l, 200 μ l), ディスポーザブル微量遠心管(1.5ml, 0.2ml あるいは 0.5ml), ディスポーザブル遠心管(50ml 程度), フィルター付き滅菌バッグ, ディスポーザブルスポイト(2.0ml および 5.0ml 程度), 1.5ml 微量遠心管用遠心分離機, 低速遠心分離機 (50ml ディスポーザブル遠心管を 1,870 \times g(3,000rpm 程度)で遠心できる機器), ペーパータオル, 超音波洗浄器*1(ガラス器具洗浄に用いる水槽タイプのもの, 40kHz 程度), ボルテックスミキサー, 37℃フラン器(恒温槽でも可)

2) 試薬(逆転写反応までのもの)

① 自家調製したものまたは各検査機関が保有する試薬等を使用するもの

食品洗滌液 (0.1M Tris・HCl - 0.5M NaCl - 0.1% Tween20 (pH8.4))

クロロホルム

エタノール

QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)

dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP を各 20mM になるように混合)

② 送付された試薬等を使用するもの

ガンマグロブリン製剤(ガンマガード)

αアミラーゼ粉末(和光純薬, 013-03732)

αアミラーゼ Ultrapure(ニッポンジーン, 310-04754)

黄色ブドウ球菌加工試薬(「PANSORBIN® Cells」, Calbiochem 507861-50Ml)

TRIzol®-LS (invitrogen)

DNase I (ニッポンジーン, 313-03161)

RNase inhibitor (ニッポンジーン, 181-01821)

RTmate (ニッポンジーン, 315-05941),

ReverTra Ace® (東洋紡, TRT-101)

逆転写反応専用プライマー(PANRG2、100mM)

PANR-G2a: 5' TCYARWKKYCTWACATCTAYAATYAYRTGGGGGAACAT 3'

PANR-G2b: 5' ARDGTCCCTAACATCWATAATYAYATGAGGGGAACAT 3'

PANR-G2c: 5' CTSACATCCACMAYYACRTGCGGRCACAT 3'

100 μ M PANR-G2a, 100 μ M PANR-G2b, および 100 μ M PANR-G2c を 2:1:1 で混合したもの

3. 検査の実施

検査開始日時および検査終了日時を記入してください。

検査開始日時	平成	年	月	日	(午前・午後)	時	分
検査終了日時	平成	年	月	日	(午前・午後)	時	分

① 食品検体の処理方法

検体はきな粉 5g にウイルス液 50 μ l(対照は無添加)を加えた後、食品洗滌液 10ml を加えてよく

混和したもの。

- 1) 食品検体に食品洗滌液 40ml を加えてよく混ぜた後、全量をフィルター付き滅菌バッグにデカント等で移す。
- 2) 食品検体と食品洗滌液の入ったフィルター付き滅菌バッグを食品浮遊液が水浴に沈むように超音波洗浄器に着けて、15 分間処理する。超音波洗浄器を用いない場合は、バッグの上から手でよく揉みほぐして食品に付着しているウイルス粒子を洗い出す。

超音波洗浄器の使用の有無	超音波洗浄器を(使用・未使用) 仕様した場合、使用機器の名称 ()社() 周波数()KHz
--------------	---

- 3) 空の 50ml ディスポーザブル遠心管に α アミラーゼ粉末 100mg を量り取る(検体の数だけ準備する)。
- 4) 超音波処理後のフィルター付き滅菌バッグからフィルター濾液約 40ml を、 α アミラーゼ粉末の入った遠心管に採取してよく混合する(α アミラーゼ粉末は不溶性成分を含むため完全には溶けない)。採取量を表 1 に記入する。
- 5) 1,870×g(3,000rpm)、30 分間、室温(25°Cに設定する)で遠心する。この段階で、食品残渣と α アミラーゼ粉末の不溶性成分が沈澱する。
- 6) ディスポーザブルスポイト等を用いて、上清を別の 50ml ディスポーザブル遠心管に移す。この上清は濁っているがそのまま問題はない。採取量を下表に記入する

表 採取量

検体番号	4) フィルター濾液の採取量(ml)	6) 遠心上清の採取量(ml)
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		

8		
9		

- 7) ガンマグロブリン製剤(5%ガンマグロブリン)150 μ lを添加してよく混合する。
- 8) 黄色ブドウ球菌加工試薬(PANSORBIN[®] Cells) 1.0ml を添加してよく混合し、37 $^{\circ}$ C(フランシカ恒温槽)で15分間静置する。
- 9) 1,870 \times g(3,000rpm)、20分間、室温(25 $^{\circ}$ C)で遠心する。この段階で、ウイルス粒子を吸着した黄色ブドウ球菌が沈澱する。この遠心条件で沈澱する食品残渣はすでに除去済みであるから、上清が濁っていたとしてもここで沈澱してくることはない。
- 10) 50ml ディスポーザブル遠心管をデカントして上清を捨てる。
- 11) 黄色ブドウ球菌が沈澱している遠心管をペーパータオルの上で逆さにして、わずかに残った上清を吸い取る。
- 12) AVLBuffer (QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit に添付されているもの) 0.25ml(キャリア RNA を添加したもの)と TRIzol[®]-LS 0.75ml を遠心管に入れて黄色ブドウ球菌の沈澱を懸濁し、1.5ml ディスポーザブル微量遠心管に移す。懸濁と微量遠心管に移す操作はディスポーザブルスポイトを使う(マイクロピペットの汚染を避けるため)。
- 13) クロロホルム 0.2ml を加えて、ボルテックスミキサーでよく混ぜた後 13,000 \times g(12,000rpm)で15分間遠心する。
- 14) 水層を別の微量遠心管に移し、0.8倍量のエタノール(水層が650 μ lの場合は、エタノールを520 μ l 添加する)を加えてボルテックスミキサーでよく混合する。
- 15) 得られた液 630 μ l を QIAamp スピнкаラム(2ml コレクションチューブの中にスピнкаラムが装着されている。)に入れ、6,000 \times g(8,100 rpm)、1分間遠心する。QIAamp スピнкаラムを新しい 2ml のチューブに移し、残りの液(630 μ l より少量。多い場合は再度同様の操作を繰り返す)をカラム入れ、同様に遠心する。
- 16) 以降は QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit の説明書に従い、AW1 の添加、遠心、AW2 の添加、遠心、AVE への回収等を行うことで、RNA 抽出液が得られる。AVE は説明書どおり、60 μ l 用いる。
- 17) 抽出した RNA は-80 $^{\circ}$ C以下で凍結保存する。cDNA を合成する場合は次に進む。

② 接種ウイルス(食品検体に接種したウイルス液)の処理法

食品に添加したウイルスは高濃度ウイルス液と低濃度ウイルス液の2種類で、それぞれ食品

5g 当たり 50 μ l 添加されている。送付したものは高濃度ウイルス液と低濃度ウイルス液、それぞれ 50 μ l に 10% Beef extract 加 MEM 90 μ l 加えたもの、およびそれを AVL(キャリア RNA を含む)560 μ l に添加したもの、計 4 本である。蓋を開く前に、必ずスピンドウンを行う。

(a) AVL に溶かしたもの。

1) 室温で 10 分間放置後、エタノール 560 μ l を加え、以降は QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit の説明書に従い、操作する。AVE は 60 μ l を用いる。

(b) ウイルス保護液 90 μ l を加えたもの

1) 全量(140 μ l)を RNA 抽出検体として、QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit の説明書に従い、RNA 抽出を行う。AVE は 60 μ l を用いる。

③ DNase-Amylase 処理および逆転写反応

1) 表 1 のとおり、13.5 検体分(食品検体 9 検体、接種ウイルス液 4 検体=13 検体分。0.5 検体は分注ロス)の DNase-Amylase 処理混合液を調製する。

表 1 DNase-Amylase 処理混合液

試薬	1 検体当たりの使用量 (μ l)	13.5 検体分 (μ l)
5 \times RT Buffer (ReverTra Ace [®] 添付)	4.0	54
RNase inhibitor	0.25	3.375
DNase I	1.0	13.5
α -アミラーゼ Ultrapure	1.0	13.5

2) 0.2ml, 0.5ml あるいは 1.5ml の微量遠心管に DNase-Amylase 処理混合液を 6.25 μ l ずつ 13 本に分注する。

3) 抽出 RNA 液 9.25 μ l を加え、タッピングで混和後、スピンドウンを行う。

4) 37 $^{\circ}$ C で 10 分間反応させる。

5) 65 $^{\circ}$ C で 5 分加温し、氷水中で急冷する(温度コントローラを用いる場合でも、必ず、氷水中で急冷する)。3 分間放置する。

6) 表 2 に従って、13.5 検体分の逆転写反応液を調製する。

表 2 逆転写反応液

試薬	1 検体当たりの使用量 (μ l)	13.5 検体分 (μ l)
RTmate	2.0	27
20mM dNTP	1.0	13.5
PANR-G2 (100 μ M)	0.5	6.75
ReverTra Ace [®]	1.0	13.5

- 7) 表 2 で調製した RT 反応液 4.5 μ l を, 5) で急冷した DNase-Amylase 処理混合液(15.5 μ l) に加える。ここで全量が 20 μ l となる。
- 8) 42°C で 30 分間、逆転写反応を行った後、95°C、5 分加熱する。これで cDNA 合成が完了する。
- 9) DNase-Amylase 処理、逆転写反応の条件等を下表に記入する。

使用チューブ		(0.2ml・0.5ml) 遠心管
DNase-Amylase 処理	37°C、10 分反応	(温浴中・温度コントローラ)
逆転写反応	42°C、30 分反応	(温浴中・温度コントローラ)
	95°C、5 分	(煮沸水中・温度コントローラ)
	冷却	(氷水中・器械のプログラムによる)

④ リアルタイム PCR 法、nested リアルタイム PCR および nested PCR 法の陽性コントロール送付した NoV GII の cDNA は 5 μ l を鋳型 DNA としてリアルタイム PCR を行った場合、10⁵ コピーを示す量を含みます。各試験の陽性コントロールとして用いてください。使用前には蓋をあける前に、必ずスピンドウンしてください。

⑤ リアルタイム PCR 法

1 検体について 2 ウェルを使用して、通知法に基本的に準じて検査機関が通常実施している方法に従って NoV GII のリアルタイム PCR 法を実施してください。検査は、食品検体 9 検体、添加ウイルス液 4 検体に加え、送付した NoV cDNA1 検体、計 14 検体について同時に測定してください。

結果は別添のエクセルファイルに記入してください。

⑥nested PCR 法

通知法に基本的に準じて検査機関が通常実施している方法に従って NoVGII の nestedPCR 法を実施してください。検査は、食品検体 9 検体、添加ウイルス液 4 検体に加え、送付した NoV cDNA1 検体、計 14 検体について実施してください。nestedPCR 法における増幅産物の有無の判定はアガロースゲル電気泳動で行い、その結果を写真撮影してください。陽性となった場合 DNA バンドをゲルから切り出した後、シーケンス反応を実施してください(陽性コントロールのシーケンスは不要)。

シーケンス反応は陽性と判定とした最も薄いバンド(増幅 DNA が少ないと思われる)検体から検査してください。少なくとも 2 検体が陽性となればシーケンス検査は終了していただいて結構です。

諸般の事情によりシーケンス検査が実施できない場合は、ゲルから切り出した DNA サンプルを国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部野田に郵送ください。

結果は、添付のエクセルファイルに記入してください。シーケンスデータのエクセルファイルに記入してください。

⑦nested リアルタイム PCR 法

⑥の nested PCR の検査過程で得た 1st PCR 産物を鋳型 DNA として、⑤のリアルタイム PCR 法に準じて、NoV GII 検出のリアルタイム PCR 法を実施してください。

結果は、添付のエクセルファイルに記入してください。

以上の、リアルタイム PCR 法、nested リアルタイム PCR および nested PCR 法の陽性コントロールの反応条件等を下表に記入してください。

表 リアルタイム PCR 法、nested リアルタイム PCR の条件

使用機器	メーカー名() 機器名 ()
使用キット(試薬名)	メーカー名()

	キット名 () (例) メーカー名 (Life technologies(旧 ABI))、 キット名 (Taqman® Universal PCR Master Mix)	
鋳型 DNA 量と反応液量	リアルタイム PCR	Nested リアルタイム PCR
	鋳型 DNA 量() μ l 反応液量() μ l	鋳型 DNA 量() μ l 反応液量() μ l
反応条件	() (例) 50°C:2分⇒95°C:10分⇒(95°C:15秒⇒56°C:1分)×50回	
使用プライマー・プローブ	F-primer() (例) COG2F R-primer() (例) COG2F(と ALPF) Probe() (例) RINGAL-TP(RING2-TP) Probe の標識() (例) 5' FAM, 3' TAMRA	

表 Semi-nested PCR 法の条件

使用機器	メーカー名 () 機器名 ()	
使用耐 DNA 合成酵素名	メーカー名 () 酵素名 () (例) メーカー名 (TaKaRa)、 酵素名 (TaKaRa EX Taq)	
鋳型 DNA 量と反応液量	1 st PCR	Semi-nested PCR
	鋳型 DNA 量() μ l 反応液量() μ l	鋳型 DNA 量() μ l 反応液量() μ l
反応条件	1 st PCR:	
	Semi-nested PCR:	

	(例) (95°C:30 秒⇒50°C:1 秒⇒72°C:1 分)×35 回⇒72°C:10 分⇒ 4°C保存
使用プライマー	1 st PCR: F-primer() (例) COG2F(ALPF) R-primer() (例) G2SKR (G2ALSKR)
	Semi-nested PCR F-primer() (例) G2SKF R-primer() (例)

(お問い合わせ)

〒158-8501

東京都世田谷区上用賀 1-18-1

国立医薬品食品衛生研究所

食品衛生管理部第四室

野田 衛

電話 03-3700-9104(直通)

E-mail mamorunoda@nihs.go.jp

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

平成 24 年度 研究協力報告書

田中 智之
篠原 美千代
植木 洋
田村 務
吉澄 志磨
森 功次
入谷 展弘
小林 慎一
山下 育孝
飯塚 節子

重本 直樹
小和田 和誠
三上 稔之
名古屋 真弓
内野 清子
世良 暢之
森田 晴美
山本 美和子
原田 誠也
北元 憲利

平成 25 (2013) 年 3 月

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」

研究協力者 総括報告書

研究分担者	田中 智之	堺市衛生研究所
研究協力者	吉澄 志磨	北海道立衛生研究所
	三上 稔之	青森県環境保健センター
	森田 晴美	岩手県環境保健研究センター
	篠原 美千代	埼玉県衛生研究所
	森 功次	東京都健康安全研究センター
	田村 務	新潟県保健環境科学研究所
	名古屋 真弓	富山県衛生研究所
	小和田 和誠	福井県衛生環境研究センター
	小林 慎一	愛知県衛生研究所
	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
	北元 憲利	兵庫県立大学環境人間学部
	飯塚 節子	島根県保健環境科学研究所
	重本 直樹	広島県立総合技術研究所・保健環境センター
	山本美和子	広島市衛生研究所
	山下 育孝	愛媛県立衛生環境研究所
	原田 誠也	熊本県保健環境科学研究所
	世良 暢之	福岡県保健環境研究所

研究総括

今年度の野田班研究協力者による研究報告は次の6分野に大別された。

1. 本班の一つの重要テーマであった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;パンソルビン・トラップ法によって食材からウイルス遺伝子が検出され因果関係が同定された。実用化の段階である。これ以外に非結晶リン酸カルシウム微粒子による方法は実例事例での応用・評価の段階である。牛血清アルブミンと PEG を用いた水性二相分配法による食材中のウイルス濃縮法として回収率の良い成績が得られた。しかし、想定される調理現場でのウイルス汚染が機材の材質の違いにより回収率に差がみられること

が判明し、検討が残された。

2. 食中毒事例からノロウイルスを含めた他の病原ウイルス、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、パレコウイルス、ボカウイルス、アデノウイルスなどの関与について多くの事例から疫学的・遺伝子学的解析を行い、効率的な検査体制の構築、サーベイランスの意義が示された。
3. 食中毒事例のウイルス遺伝子検査法として、多数のウイルス関与を解析する目的で、Multiplex PCR 法が構築され、迅速性、特異性に優れた成績が報告された。原因ウイルスが正確に特定でき、実際の事例での運用が期待される段階である。
4. 環境サーベイランスとして、下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、カキからの検出方法の改善、カキ中のヒト糞便由来 F 特異 RNA 大腸菌ファ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では養豚場のブタに高率な 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) を抗原とし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

本研究班はウイルスを介した食中毒事例の原因を解明・集約し、この研究成果を通じて広く食の安心・安全に寄与することを目的としている。

地方衛生研究所(地衛研)はその原因究明に最前線に対応し、保健所と共に感染防止について提言し健康安全に寄与するとともに啓発活動の一端を担っている。

この分担研究班では北海道から九州に至る本邦 19 地衛研の研究協力者を中心に食中毒の原因の科学的な解明を行っている。多数の食中毒事例の

対応から多種多様な原因ウイルスが検出され、検査の迅速性、効率性を図ることが基本課題となり、ひいては食の安心・安全の礎となっている。

今年度はノロウイルスの変異により過去二番目の大きな流行となり、1,000 人を超える大規模な食中毒事例が見られた。ウイルス変異による要因が大規模発生繋がったことは論を待たないが、基本的予防指針の遵守が十分でなかった事例も数多くみられた。

下記に述べる研究成果は各研究協力者が昨年度からの課題として目的意識を持ち検査技術の向上、積極的な

調査研究の賜物と考える。

昨年度と同様に、ノロウイルス食中毒事例の原因(疑)食材からノロウイルス遺伝子検出法がほぼ完成の域に達したパンソルビン・トラップ法以外の方法も検出感度の向上がなされ、広角的な検査体制への足固めが出来つつある。また、ウイルス性食中毒事例には、ノロウイルス(NV)以外の多くの原因ウイルスの関与があることも判明してきた。これら複数のウイルスを感度よく効率且つ迅速に検出する方法が開発された。

また、環境中のウイルスによる食品汚染や環境媒体によるウイルスの食中毒関与の頻度など、調査研究なくしては出来ない大きな課題である。

今年度の全国地衛研研究協力者による調査研究内容は、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)食材中 NV 遺伝子の検出・同定法の開発について。
- (2): ウイルス性食中毒事例からノロウイルスを含めた他の病原ウイルス、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、パレコウイルス、ボカウイルス、アデノウイルスの関与について、病因論的ウイルス学的特徴について考察する。
- (3): ノロウイルス以外の他のウイルスによる食中毒への関与を確認するための検査法として構築した Multiplex PCR 法による診断意義、実施適応について。
- (4): 下水処理施設における流入水・放流水、河川水等からのノロウイ

ルス遺伝子検出、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、ウイルス検出による食の安全への貢献度について。
 - (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抗原診断法の開発について。
- これらの6点の研究成果に焦点を合わせて総括する。

B. 研究材料と方法

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検体を中心とした臨床材料、事例に関連する食材等を用いた。環境材料では下水関連の環境水等を用いた。さらにウイルスの蓄積が考えられる二枚貝等を用いた。動物由来材料は屠場等で処理される際の検体を材料とした。

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、相同性を比較しは国立感染症研究所下痢症ウイルス検出マニュアルに準じた。

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・トラップ法以外の非結晶リン酸カルシウム微粒子による濃縮法、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、環境検体を直接に濃縮する方法、媒体である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

やカキ等からウイルス遺伝子の検出がなされた。サポウイルス迅速診断法の開発にはサポウイルスウイルス中空粒子 (VLPs) を抗原として作成されたモノクローナル抗体を用いた。(これら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

結果(1)

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法の開発に関する研究では、すでにパンソルビン・トラップ法は完成の域に達している。実事例の原因推定食品を用いた本邦の運用・評価が望まれる。

食材中のウイルス濃縮法として、①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、細胞培養による増殖可能なカリシウイルス科ネコカリシウイルス(FCV)や一部 NV を用いた添加・回収実験を試みた。昨年度まで 35 種類、今年度は 6 種類の食材を用い、洗浄の工夫による濃縮効果を検討した。その結果、一部の食材では FCV は尚低回収率ではあるが前年度に大幅に向上した。食材により回収率が異なるが、今後は実際の事例からの材料で NV 回収検査が強く望まれ

る(篠原)。

②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、実際の汚染場所を想定して NV を汚染させ、市販のふきとりキットを用いて回収率の比較を行った。抽出用緩衝液に界面活性剤を添加することにより NV 回収率の向上がみられた。今後、種々の条件設定での回収率向上も期待されるが、汚染現場の多くはステンレス製の構成材質と想定されるが、その回収率が低いことは今後のさらなる検討が必要である(田村)。

結果(2)

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。ノロウイルスの関与は、ウイルス検出胃腸炎事例 206 検体中 127 検体(61.7%)の報告(小林)、356 例中 335 例(94%)の報告(森)、109 例(52.2%)の関与(山下)、集団感染事例では 29 事例中 28 例(95.2%)の報告(名古屋)がある。詳細な解析として、二枚貝関連食中毒事例と非関連事例の 2 群で解析すると、前者では 5 事例(100%)、後者では 61 事例中ノロウイルスのみ検出が 47 事例(77%)で中学生以上の年齢層に限定するとさらに 31 事例(82%)であった(吉澄)。28 事例中 3 事例(11%)がカキ関連事例の報告もある(名古屋)。その他のウイルスの関与では、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。

二枚貝(カキ等)関連事例ではノロウイルス以外にもサポウイルス(森、吉澄)、エンテロウイルス(入谷)、A群ロタウイルス(吉澄)などが関与している。

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昨年同様にA群ロタウイルス感染に警鐘する報告もある(吉澄)。二枚貝からA型肝炎は検出されていない。

注目すべきノロウイルス変異株(キメラウイルス)についての解析は、入谷、山下、田中らの報告があるが、変異株を検出していない報告もあり(小林)、多分採取検体のバイアスによる結果と思われる。その他の病原ウイルスの特徴として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。

結果(3)

RT マルチプレックス PCR 法による下痢症ウイルス検出系の構築は2研究協力者から報告された。検出ウイルス遺伝子は、ノロウイルス、サポウイルス、アストロウイルス、アイチウイルス、ボカウイルス、パレコウイルス、A群ロタウイルス、C群ロタウイルス、アデノウイルス(重本)、ノロウイルス、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、エンテロウイルス(小和田)である。反応産物における標識蛍光色素の目視による検出(重本)、ダイレクトシークエンスによる塩基配列決定・遺伝子型の決定(小和田)と測定方法に違

いはあるが、多種ウイルスを高感度に検出できる点は共通であり、ノロウイルス以外の食中毒関与ウイルスの有無を特定できる優れた検出方法である。今後はコストパフォーマンスを考慮した広域な活用が望まれる。

結果(4) 下水処理施設における流入水、放水、河川水等の環境水におけるノロウイルス汚染状況を調査した(三上、森田、名古屋、内野、山本、世良)。検出方法は直接に採水から遺伝子を濃縮・検出する方法と(三上、森田、名古屋、内野)と間接媒体を用いる方法(山本)、生活環として存在するカキからノロウイルスを検出する方法(植木、入谷)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、多くは流入水からの検出であった。しかし、胃腸炎患者の少ない時期では放流水からノロウイルス遺伝子は検出されないが、患者数の増加の場合は下水処理能力以上のウイルスが流入しウイルス遺伝子が検出されたという示唆に富む報告がある(森田)。関連部局との話題提供の価値は高い。また、雨水を含む分流水は含まない場合よりウイルス量に10~100倍多く検出されたという成績は、環境サーベイランスには気象条件の関与も考慮しなければならないことを示唆している(三上)。季節的なウイルス検出頻度では、流行期に

一致している(森田)、アイチウイルスやアストロウイルスは通年的に検出された報告もあるがサーベイランスの実状とは乖離している(内野)との報告もある。

生カキからの検出率をみると、市販国産食用生カキから 22%の頻度で GII.3, GII.4 ノロウイルスが検出された。GII.4 ではキメラ型変異株であった(入谷)。環境中にキメラウイルスの侵淫が示唆された。従来、カキ中腸腺からの RNA 抽出法ではアミラーゼ等の酵素処理が有効である。しかし、処理過程がやや複雑なため、新しい抽出法が試みられている。カキ中腸腺細胞を粉砕により遺伝子抽出効果を高める方法が試案されているが、今後の運用を期待したい(植木)。また、カキ中の F フェージ遺伝子検出とノロウイルス遺伝子検出率との一致率を比較する方法はこれまでに考案されている。II 群 F フェージとノロウイルス G2 との一致率は 80.4%、サポウイルスとの一致率は 78.4%と高い結果であった。また、II 群フェージとノロウイルス G2 のコピー数の相関係数では 0.86 と正の相関がみられた(山本)。F フェージのプラーク検出法が構築できれば、カキ中のノロウイルス検出が biological に検出可能であり意義の高い検出法の構築と期待できる。

食中毒事例の原因食材と同定されたアサリからサポウイルス検出法の改良が加えられ、従来法に比し高い検出率が示された。今後のサポウイルス遺伝子検出には強力なツールとなる

と考えられる(飯塚)。この新しい測定法は、今後、サポウイルスと関連食中毒のサーベイランスシステムの向上に寄与できる。

いずれの食中毒事例からは A 型肝炎ウイルス遺伝子は検出されていない(入谷、三上、)。

結果(5) E 型肝炎ウイルスの浸淫状況では、野生イノシシ、シカからウイルス遺伝子は検出されずと畜されたブタから HEV 3 型が 1.0%に検出された。イノシシはこれまで高率な HEV キャリアー動物である。今後の継続調査が望まれる。ブタ HEC は養豚場による検出率に差があることも判明した。豚は HEV 感染リスクが高いことを示す結果であるが、平成 24 年 7 月 1 日から生食用牛肝臓の販売が禁止になり、ブタ肝臓が代用食品となる危険性が浮上している。この成績を通して消費者へのブタ肝臓生食の危険性を啓発する科学的根拠である(原田)。

結果(6)

サポウイルス GIV 型 VLPs を免疫源としてモノクローナル抗体の作製を試みた。すべてのサポウイルス Genogroups に反応する抗体が作成された。昨年度の抗体を用いたイムノクロマト法では臨床検体との反応性が乏しかったことから、これらの抗体を用いてサポウイルス迅速診断キットの構築が期待される(北元)。

D. 今後の課題

1. 食材から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

法以外の検査法におい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は高精度の回収率が認められている。今後は食中毒事例検体を用いた検査・評価に移行すべきと考える。牛血清アルブミンと PEG を用いた水性二相分配法は、現場でのノロウイルス汚染区域の材質の差による検出率の検討が必要である。

2. ノロウイルスの遺伝子変異はノロウイルス感染症・食中毒の流行拡大の大きな要因である。各地域における遺伝子解析情報を密に共有し感染予防対策に資する。

また、複数のウイルス遺伝子検出感染事例の背景を詳細に解析し、ウイルス感染病理の解明に資する。

地方衛生研究所の持つ最大の武器、すなわち多数の臨床検体の解析、

を活用し臨床面への還元とともに積極的な調査研究を行う。

3. Multiplex PCR 法は、ほぼ完成の域に達していると思われるが、コストパフォーマンスのもと、検出方法の普及が求められる。
4. 環境中における食中毒原因ウイルスの検出、情報の提供、発生状況のモニタリングとの密な関連性を高め、この科学的情報を感染症予防対策に活用できる施策を構築する。
5. 養豚場におけるブタは E 型肝炎ハイリスク動物であることが明瞭となった。ブタ肉の喫食を含めて E 型肝炎ウイルス感染防止に向けて関係部局との啓発活動が今後の大きな課題である。
6. サポウイルス迅速診断法の構築・実用化を図る。