

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」

研究協力報告

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 —冷凍および生鮮果実からのウイルス回収—

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	埼玉県衛生研究所
研究協力者	島田 慎一	埼玉県衛生研究所
研究協力者	富岡 恭子	埼玉県衛生研究所
研究協力者	鈴木 典子	埼玉県衛生研究所
研究協力者	貫洞 里美	埼玉県衛生研究所
研究協力者	小川 泰卓	埼玉県衛生研究所
研究協力者	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、平成 22 年度、23 年度は種々の食品を用いてネコカリシウイルス (FCV) 添加回収実験を行った。その結果、一部の食品でウイルス回収率が低いことが判明した。回収率の低かった食品のうち、油脂含有食品については、食品洗浄液を Tris-glycine 液に変更し、さらにイソアミルアルコール処理を追加することで、回収率が大幅に改善された。今年度は、低回収率の食品のうち、海外でたびたび広域食中毒を起こしている冷凍ラズベリーを中心に、冷凍および生鮮果実からの添加ウイルス回収方法の改良を検討した。冷凍および生鮮果実では、食品洗浄液を 3% ビーフエキス加 PBS に変更することで、回収率が大幅に改善された。

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。国内ではカキ等二枚貝のほか、種々の食品が食中毒の原因食品として推定されている。また、国外ではレタス等の生鮮野菜や冷凍ラズベリーを原因とす

る食中毒の広域発生が複数報告されている。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、さらに、食品中に酵素反応阻害物質が存在することなどから、食品中からのウイルス検出は極めて困難で、その検出報告例も少ない。これ

までに様々なウイルス検出法が報告されているが、より簡便で効率の良い方法の開発が求められている。

本研究では、短時間で簡便に実施でき、かつ特殊な試薬や機器を必要としないウイルス濃縮法として、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、冷凍および生鮮果実からの回収を効率よく実施するために、操作法の改良を検討した。

B. 研究方法

1. 供試食品

添加回収実験には、スーパーマーケットおよびインターネットストアで入手した冷凍果実を用いた。具体的には、冷凍ラズベリー、冷凍ストロベリー、冷凍ブルーベリー、生鮮ストロベリー、生鮮ブルーベリー、生鮮パイナップルの 6 検体を検討の対象とした。

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 10g に FCV $6.4 \times 10^3 - 2.7 \times 10^5$ コピーを添加した。冷凍果実は解凍後 FCV を添加した。

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 40ml を添加して 10 分間振とうした。冷凍ラズベリーを用いた検討では、食品洗浄液に PBS (-) (以下 PBS と記載)、3% ビーフエキスを加 PBS (-) (以下 BE 加 PBS と記載)、

Tris-glycine 液 (pH9.5) (100mM Tris、50mM glycine)、3% ビーフエキス加 Tris-glycine 液 (pH9.5) (以下 BE 加 Tris-glycine 液と記載) を用い、他の果実には BE 加 PBS を用いた。以下の操作は昨年度同様に実施した。冷凍ラズベリーでは、ACP 微粒子を加えて攪拌する際に、ペクチナーゼ (マセラゼ) 0.04g を添加する方法も検討した。

5. ウイルス RNA の抽出方

昨年度と同様に実施した。

6. 逆転写反応

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

昨年度と同様に実施した。

8. 回収率の評価

回収率の区分は 1-5% : 低回収率、6-10% : 中程度の回収率、11-20% : 高回収率 (J. Virol. Methods, 169, 22-27, 2010) を参考にし、10% 以下を低い回収率、11% 以上を回収率が良いものとして評価した。

(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. 冷凍ラズベリーについての検討結果

種々の洗浄液を用いた場合およびペクチナーゼを添加した場合の冷凍ラズベリーからの添加 FCV 回収結果を表 1 に示した。PBS、Tris-glycine 液で洗浄した場合にはともに 2% の回収率であった。ペクチナーゼ処理を追加すると、Tris-glycine

液では3%、PBSでは8%となった。一方、BE加PBSを洗浄液に用いると56%の回収率となったが、BE加Tris-glycine液の場合には、回収率は改善されなかった。

2. 冷凍果実および生鮮果実からのFCV回収結果

冷凍ラズベリーでウイルス回収率の改善が認められたBE加PBSを用いて実施した他の果実の添加回収実験結果を表2に示した。どの果実からもBE加PBSを用いて効率よくFCVが回収された。

D. 考察

昨年度までの添加回収実験で、回収率の低かった冷凍ラズベリーからの回収方法を検討した。冷凍ラズベリーは果実の形状が複雑で、洗浄によりウイルスを誘出することが難しいことと、解凍時に溶出する果汁中のペクチンにより濃縮や酵素反応が阻害されることが報告されている。これを回避するために種々の処理方法が検討されており、ビーフエキスを添加したpHの高い洗浄液を用いることと、ペクチナーゼ処理をすることを組み合わせた方法が多数報告されている¹⁻²⁾。本研究でも、Tris-glycine液を用いてビーフエキスの添加とペクチナーゼ処理を試みたところ、回収率の改善は見られなかった。この結果は、高pHの洗浄液を使用することにより、果実の損傷がPBSに比べて激しく、内容液の流出も多いためではないかと考えられた。実際に、Tris-glycine液を用いて洗浄した後の液は、PBSを用いた場合よりもろ過がしにくく、粘性が高くなっており、また、食品残渣を除去するために実施した遠心後に

沈渣が多く認められた。高pH洗浄液の効果が認められなかったため、細胞損傷が少ないと思われるPBSを用いて、ビーフエキス添加とペクチナーゼ処理を実施した。ペクチナーゼ処理では回収率に若干の改善が認められたが、回収率は10%未満であり、効果的な方法とはならなかった。これに対し、BE加PBSを用いた場合、回収率は平均で56%と大きく改善された。BE加PBSでは、洗浄後の液にほとんど粘性が認められず、ろ過も容易に行うことができた。以上の結果から、冷凍ラズベリーでは、BE加PBSを用いることで、その他の手順を変更することなく効率的にウイルスを回収できることが判明した。

冷凍ラズベリーで検証した方法を、他の冷凍果実および生鮮果実に応用したところ、いずれの果実からも効率良く添加FCVを回収することができたが、冷凍果実では回収率が一定せずばらつきが多い傾向が見られた。この結果は、トレーに置いた冷凍果実にFCVを添加して放置した際に、果汁が流れ出て、これをストマッカーバッグにすべて移すことができたか否かによる差ではないかと考えられた。生鮮果実では回収率は安定していた。生鮮果実、特にブルーベリーでは、PBSを加えた時に、洗浄液をはじいてしまい、液中に没することがなかったが、ビーフエキスを添加することにより、洗浄液が果実全体を覆うことが可能となり、これにより、果実表面からの添加ウイルス誘出が促進されたのではないかと推測された。

なお、BE加PBSを、これまでに検討した食品にも使用したところ、野菜類で回収率が上がり、また、他の食品でも、有

効性が認められたので、基本の洗浄液を BE 加 PBS に変更することも、今後検討していく予定である。

＊参考文献

- 1) Baert et al., J. Food Microbiol., 2008, 123, 101-108.
- 2) Dubois et al., J. Food Prot., 2002, 65, 1962-1969.

E. 結論

洗浄液に PBS を用いた FCV の添加回収実験で回収率の非常に低かった冷凍ブルーベリーを用いて、回収方法の改良を検討した。冷凍ブルーベリーの処理に適していると報告されている BE 加 Tris-glycine 液を洗浄液に用いるよりも、BE 加 PBS を用いる方が回収率は高く、56% のウイルスが回収された。さらに、BE 加

PBS を用いて、他の冷凍および生鮮果実からウイルス回収を行ったところ、同様に高い回収率を得ることができた。ACP 微粒子濃縮法は洗浄液を変えることにより、操作法の変更なしに冷凍および生鮮果実からの添加ウイルス濃縮にも使用可能なことが示された。

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

表1 冷凍ラズベリーからの処理方法別FCV回収結果

洗浄液等	検体数	FCV添加量	FCV回収率 (%)	平均回収率 (%)
PBS	4	1.1×10^4 – 7.5×10^4	0.4–4	2
Tris	4	9.2×10^3	0.4–3	2
PBS+ペクチナーゼ処理	10	7.5×10^4	5–11	8
Tris+ペクチナーゼ処理	8	6.4×10^3 – 9.2×10^3	2–6	3
3%BE加PBS	4	1.1×10^4	44–68	56
3%BE加Tris	8	9.3×10^3 – 1.9×10^4	2–6	4

BE: ビーフエキス Tris: Tris-glycine 液 (pH9.5)

表2 冷凍および生鮮果実からのFCV回収結果 (洗浄液: 3%BE加PBS)

食品名	検体数	FCV添加量 (copy)	FCV回収率 (%)	平均回収率 (%)
冷凍ブルーベリー	2	1.1×10^4	34–89	61
冷凍ストロベリー	3	2.0×10^4	11–80	38
生鮮ブルーベリー	2	1.1×10^4	182–188	185
生鮮ストロベリー	2	1.1×10^4	20–26	23
生鮮パイナップル	2	2.0×10^4	36–38	32

細胞破碎法によるカキ中腸腺からのノロウイルス (NoV)

抽出方法の検討

研究協力者	植木 洋	宮城県保健環境センター
研究分担者	田中智之	堺市衛生研究所
研究協力者	川端淑子	宮城県保健環境センター

研究要旨

カキからのノロウイルス (NoV) の濃縮法としてアミラーゼ、リパーゼ等の酵素を用いた方法の代替法を確立するために、酵素を用いない細胞破碎法について基礎的検討を行った。その結果、現行の細胞破碎条件よりも中腸腺乳剤の濃度を低くし、低速で破碎することによりノロウイルス遺伝子抽出効果が高くなることが確認された。

A. 研究目的

カキからのノロウイルス (NoV) の濃縮・抽出法は、酵素 (アミラーゼ, リパーゼ) 処理が有効であるが、酵素処理は煩雑な過程もあり多検体の処理には不向きである。そこで、酵素を用いない細胞破碎法について基礎的検討を行った。

3,500rpm・10秒, 4,500rpm・60秒とした。各方法で破碎後、通知法(平成19年5月14日付け食安監発第0514004号)に基づき NoV 遺伝子を定量して検出率を比較した。

(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。

B. 研究方法

1. 材料

県内の海域で2012年2月に採取した浄化前のカキを用いた。

2. 方法

カキから中腸腺を取り出した後、中腸腺乳剤作成時に添加する蒸留水の量と破碎条件を変えて NoV 抽出処理を行った。添加蒸留水量は 1.0ml, 2.0ml, 2.5ml とし、破碎条件は 3,000rpm・10秒,

C. 研究結果

結果 (表-1、表-2)

本研究では、定量の際に蛍光強度が閾値を超えた場合に、定量値に関わらず陽性とした。

破碎処理条件と対象としたカキ検体数と平均乳剤濃度を表-1に示した。添加蒸留水量 1ml, 4,500rpm・60秒で処

理した中腸腺乳剤濃度の平均が 54.0%、同様に 2.0ml, 4,500rpm・60 秒が 52.3%、2.5ml, 4,500rpm・60 秒が 37.7%、2.5ml, 3,500rpm・10 秒が 50.8%、2.5ml, 3,000rpm・10 秒が 48.6%であった。

一方 NoV 遺伝子の検出率は、カキ中腸腺からウイルスを抽出する際に、これまで行ってきた破碎条件の添加蒸留水量 1ml, 4,500rpm・60 秒の破碎では 16.3%であったのに対し、2.0ml, 4,500rpm・60 秒が 16.7%、2.5ml, 4,500rpm・60 秒が 33.3%、2.5ml, 3,500rpm・10 秒が 25.0%で、2.5ml, 3,000rpm・10 秒が本研究で検討した破碎条件の中で最も高い検出率の 58.3%であった。

図-1 に一定破碎条件 (4,500rpm・60sec) における中腸腺乳剤濃度と NoV 遺伝子検出率の関係を示した。乳剤濃度と NoV 遺伝子の検出率に高い負の相関 ($R^2=0.9946$) が確認された。

以上の結果より、細胞破碎法による中腸腺からの NoV の抽出は、同一破碎条件であれば乳剤濃度の低い方が高い傾向が認められ、同じ添加蒸留水量であれば、低速で破碎した方が、高い抽出効果を示した。

D. 考察

カキ中腸腺から NoV を抽出し PCR 法で遺伝子を検出する際に、カキ由来の有機物によって核酸の検出が阻害される。特にアミラーゼ、リパーゼ等の酵素を用いない NoV 抽出法である細胞破碎法では顕著で、本研究においても同じ乳剤濃度では中腸腺の破碎が微細になるほど高くな

る傾向が認められた。このことは乳剤作成時の添加蒸留水量を一定にした場合に、低速で破碎した方が NoV 遺伝子の検出率が高かった結果からも裏付けられた。特に中腸腺乳剤の濃度が高い場合には、遠心後の乳剤に粘性が生じ NoV 遺伝子の抽出にも影響を及ぼす可能性も考えられる。

破碎条件を詳細に検討することにより、酵素処理と同等の濃縮・抽出効果が期待される。

E. 結論

アミラーゼ、リパーゼ等の酵素を用いないカキ中腸腺からの NoV 抽出法として開発した細胞破碎法について基礎的検討を行った。その結果、これまでの方法より乳剤濃度を低く調整し、低速で破碎することにより高いノロウイルス遺伝子の抽出効果が確認された。

F. 研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表

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. 添加蒸留水量・破碎条件と対象としたカキ中腸腺濃度

添加蒸留水量	破碎条件	検体数	平均乳剤濃度 (%)	標準偏差
1.0ml	4,500rpm・60sec	80	54.0	7.7
2.0ml	4,500rpm・60sec	6	52.3	10.2
2.5ml	4,500rpm・60sec	6	37.7	7.8
2.5ml	3,500rpm・10sec	12	50.8	11.1
2.5ml	3,000rpm・10sec	12	48.6	13.1

表-2. 添加蒸留水量と破碎条件の違いによるNoV遺伝子の検出率

添加蒸留水量	破碎条件	検体数	検出数	検出率 (%)
1.0ml	4,500rpm・60sec	80	13	16.3
2.0ml	4,500rpm・60sec	6	1	16.7
2.5ml	4,500rpm・60sec	6	2	33.3
2.5ml	3,500rpm・10sec	12	3	25.0
2.5ml	3,000rpm・10sec	12	7	58.3

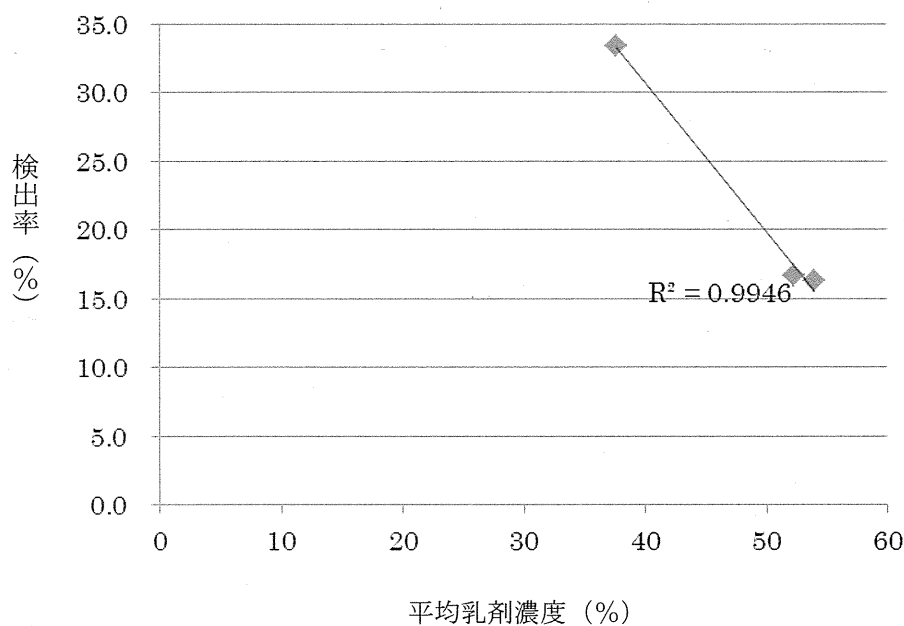


図-1 一定破碎条件 (4,500rpm・60sec) での中腸腺乳剤濃度と NoV 遺伝子検出率の関係

ノロウイルス汚染ステンレス板からのふきとりによる ウイルスの回収に関する検討

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

アルブミンとサラダ油が含まれるノロウイルス液によって汚染したステンレス板から、ふきとり法と BSA-PEG 水性二相分配法によるウイルスの濃縮法を併用して、ウイルスの回収率の把握を試みた。

市販のふきとりキットでは、回収率は 0.1%と低いが、抽出用緩衝液に界面活性剤を添加することで回収率が向上した。滅菌ガーゼによるふきとりでも、回収率は 4%と低かった。ガーゼからのウイルスの溶出効率は 75%あることから、汚染ステンレス板の作成過程でウイルス粒子が壊れる可能性が示唆され、今回の実験でふきとりによる回収率の確認はできなかった。

A. 研究目的

ノロウイルスによる表面汚染のリスク評価のため、ふきとり検体など、比較的清浄な検体からのノロウイルスの検出法として、牛血清アルブミン (BSA) とポリエチレングリコール 6000 (PEG) 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を構築した。

この方法を用い、汚染されたステンレスの表面から、ふきとり法によってどの程度ノロウイルスが検出できるか検討した。

B. 研究方法

1 材料

調理室や手指のふきとりを想定して、ノロウイルスに、タンパク質としてBSA、油脂にサラダ油を添加した。2%BSA、0.2%サラダ油入りリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に、約 10^4 個 $\sim 10^5$ 個/ $50\mu\text{l}$ となるようにノロウイルスを添加してよく混和し、これを汚染試料とした。

30cm \times 22cmのステンレス板を、10cm \times 10cmに6区画した。70%エタノールとペーパータオルで清拭し、30分間安全キャビネット内でUV照射した。これに、ノロウイルス汚染試料を、1区画 $50\mu\text{l}$ ずつ、2%BSAに浸漬した綿棒で塗布した後、安全キャビネット内で30分乾燥させて、ノロウイルス汚染ステンレス板を作成した。1つ

の条件で3回ふきとり（3区画使用）した。

ふきとり作業は縦横10往復実施し、縦と横は別の面でふきとりした。

市販のふきとりキット以外は、抽出用の緩衝液として、中性洗剤（チャーミークイック、ライオン株式会社）を0.1%添加したPBSを使用した。

緩衝液からのノロウイルスの濃縮法は、BSA-PEG水性二相分配法で行い、RNAの抽出はQIA Viral RNA mini Kit(QIAGEN)を使用した。抽出したRNAはHigh capacity RNA-to-cDNA Kit(Applied Biosystems)により逆転写したのち、通知法（ノロウイルスの検出法について、平成19年5月14日付け食安監発第0514004号）に従ってリアルタイムPCR法でノロウイルス遺伝子量を定量した。

2. ふきとり法の検討

(1) 市販のふきとりキットの検討

フキトレール（クレオス社）を用いて汚染ステンレス板からふきとりした。キット付属の緩衝液はPBSである。綿棒からのノロウイルスの溶出を容易にするために、中性洗剤を0.1%添加し、通常のPBSを使用した場合と比較した。それぞれ3区画ずつふきとりして、回収率を比較した。

(2) ガーゼによるふきとり法の検討

5cm×5cmの滅菌ガーゼを2分割し、折りたたんだものを使用してふきとりした。緩衝液500 μ lで濡らした後に、ふきとりした。

更に、70%エタノールを使用することで、通常、油脂やタンパク質をきれいに清拭することができる。そこで、滅菌ガーゼに70%エタノールを染みこませて清拭し、エタノールを使用しない場合と比較した。

(3) ガーゼからのノロウイルスの溶出効率の検討

ふきとりではガーゼや綿棒など、ふきとりする物へウイルスが吸着された後、緩衝液へ入れた場合には、容易に溶出されなければならない。そこで、ガーゼへ直接ノロウイルスを添加し、ガーゼからの溶出効率について検討した。

(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. ふきとりする機材の検討

(1) 市販のふきとりキットを用いた場合、回収率は0.09%で、緩衝液に洗剤を添加した場合に、0.8%となった（表1）。

(2) 滅菌ガーゼによるふきとり及び70%エタノールを併用した場合は、それぞれ回収率は4.05%、0.08%となり、エタノールを使用した場合は、回収率が低くなった（表2）。

(3) ガーゼからの溶出効率は、汚染試料を緩衝液に直接添加した場合と比較して74.7%となり（表3）、ガーゼからの溶出は容易と考えられた。

D. 考察

食中毒発生時の調理室におけるふきとり検体の採取は、一般に市販のふきとりキットが使用される。今回使用したキットは、綿くずが出にくい製品であり、頭部をよく絞ることができ、ふきとり作業も容易であった。しかし、溶出用緩衝液に洗剤を添加しないと回収率が低くなっ

たことから、使用時にキットの緩衝液に界面活性剤を添加して、頭部からウイルスの遊離を促進する必要があると考えられた。

カットした滅菌ガーゼが医療用として市販されていることから、現場でも容易に使用できる。ガーゼによるふきとりでは、 10^4 個の汚染量で、4%の回収率であった。また、エタノールを併用すると、見た目ではきれいに清拭できるものの、ノロウイルスの回収率は悪くなった。エタノールによるウイルス粒子の変性がある程度起こるものと思われた。

滅菌ガーゼでも、回収率は非常に低かったことから、ガーゼに吸着したノロウイルスが容易に溶出できない可能性が考えられた。そこで、ガーゼに直接汚染試料を添加して溶出効率を確認したところ、75%回収でき、溶出性は良いと思われた。

今回の実験で回収率が低い原因として、ステンレス板に汚染試料を塗布し、乾燥させた状態で、ウイルス粒子が壊れている可能性が示唆された。このことから、汚染ステンレス板のふきとりからBSE-PEG 水性二相分配法による回収の一連の実験で、実際の汚染量の推定は困難となった。今後、ステンレス板以外の汚染試料で検討が必要である。

E. 結論

アルブミンとサラダ油が含まれるノロウイルス液によって汚染したステンレス板から、ふきとり法によるウイルスの回収を試みた。市販のふきとりキットの場合、抽出用緩衝液に界面活性剤を添加することで、回収率若干改善した。滅菌ガーゼによるふきとりでも、回収率は4%と低かった。汚染ステンレス板の作成過程でウイルス粒子が壊れる可能性が示唆され、ふきとりによる回収率の確認はできなかった。

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 市販のキットを用いたふきとり検査結果

	繰り返 し数	実測値平均 (コピー数)	標準 偏差	変動 係数	回収率 (%)
溶出用PBSに洗剤 0.1%添加	3	16.8	12.0	0.72	0.80
溶出用PBSのみ	3	2.0	2.6	1.31	0.09
汚染試料から直接抽出	2	2106.2	392.5	0.19	100.00

表 2 ガーゼを用いたふきとり検査結果

	繰り返 し数	実測値平均 (コピー数)	標準 偏差	変動 係数	回収率A (%)	回収率B (%)
ガーゼ拭き取り	3	35.1	20.3	0.58	5.40	4.05
ガーゼ+エタノール拭き取り	3	0.7	1.3	1.73	0.11	0.08
汚染試料をPBSに添加して回収	2	650.1	119.1	0.18	100.00	75.00
汚染試料から直接抽出	2	866.8	6.1	0.01		100.00

※回収率 A は、汚染試料を PBS に添加し、サンプルと同様に濃縮工程を行ったものとの比較。回収率 B は、サンプルに加えた汚染試料から直接 RNA 抽出したものと
の比較。

表 3 ガーゼへの汚染試料の直接添加回収試験

	繰り返 し数	実測値平均 (コピー数)	標準 偏差	変動 係数	回収率 (%)
ガーゼへ汚染試料を直接添加	3	124.3	27.2	0.22	74.73
汚染試料を緩衝液に添加して回収	3	166.4	53.0	0.32	100.00

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

北海道で発生した二枚貝喫食事例 5 事例、非二枚貝関連の食中毒疑い事例 64 事例、中学生以上の年齢層の感染症疑い事例 47 事例についてウイルス感染の実態調査を行った。

二枚貝喫食事例では、すべての事例において患者糞便からノロウイルス (NoV) が検出され、いずれも複数の遺伝子型が確認された。NoV 以外のウイルスは、3 事例からサポウイルス (SaV)、アイチウイルス (AiV)、アストロウイルス (AstV) が検出された。このうち AstV は単独で検出され、胃腸炎発症の原因と考えられた。食中毒の原因疑い食品として二枚貝 3 ロットの検査を実施し、いずれも NoV を含む数種類のウイルスが検出された。NoV は複数の遺伝子型が確認された。二枚貝と喫食患者からの検出株の一致は、NoV では一部の株において認められ、また、NoV 以外のウイルスの検出状況は一致しなかった。

非二枚貝関連の食中毒疑い事例と中学生以上の年齢層の感染症疑い事例では、それぞれ 61 事例、38 事例からウイルスが検出された。NoV のみ検出された事例は 47 事例 (77%)、31 事例 (82%) であった。NoV が主に検出され一部検体から他のウイルスも検出された事例が 12 事例 (20%)、4 事例 (11%) あり、これを合わせると、NoV による事例は 59 事例 (97%)、35 事例 (92%) と大多数を占めた。NoV 以外のウイルスでは、食中毒疑い事例で A 群ロタウイルス (RV-A) 単独感染が 1 事例、感染症疑い事例で SaV の単独感染が 3 事例確認された。SaV と RV-A には成人年齢層の集団感染が認められたことから、食中毒を含む集団胃腸炎の起因ウイルスとして注意が必要である。

A. 研究目的

食中毒が疑われる事例の原因究明にあたり、ウイルス検索の第 1 の選択肢は NoV

である。NoV 以外の胃腸炎ウイルスについては、通常、NoV が検出されないか検出率が低い場合に検査が実施されているに過

ぎないため、食中毒起因ウイルスとしての情報蓄積は NoV に比べて大幅に遅れている。また、NoV のように成人を含む幅広い年齢層に感染し発症を引き起こすウイルスでは、①調理従事者によるウイルス持ち込みのリスクが高く、②汚染食品の喫食者における感染率や発症率が高い、と推測される。しかし、NoV 以外の胃腸炎ウイルスの感染状況については、乳幼児以外の年齢層の情報が不足している。そこで今年度は、食中毒疑い事例と中学生以上の年齢層の感染症疑い事例を対象として各種胃腸炎ウイルスの検索を行うことにより、NoV を含む胃腸炎ウイルスの食中毒への関与の実態と、成人年齢層における胃腸炎ウイルスの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 2007 年 10 月から 2012 年 8 月までに発生した集団胃腸炎のうち 116 事例を調査対象とした。内訳は、①二枚貝の喫食がみられた食中毒疑い事例：5 事例(患者糞便 24 検体、二枚貝 3 ロット)、②非二枚貝関連の食中毒疑い事例：64 事例(患者糞便 481 検体)、③高齢者施設を除く中学生以上の年齢層の感染症疑い事例：47 事例(患者糞便 236 検体)である。

2. 検索ウイルス

糞便については 9 種類:NoV、SaV、AstV、AiV、RV-A、C 群ロタウイルス(RV-C)、アデノウイルス(AdV)、パレコウイルス(PeV)及びボカウイルス(BoV)、二枚貝については 10 種類:NoV、SaV、AstV、AiV、RV-A、RV-C、AdV、PeV、A 型肝炎ウイルス

(HAV) 及び E 型肝炎ウイルス(HEV)について検索を行った。

3. 糞便検体からのウイルス遺伝子の検出

10%糞便乳剤から 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 0514004 号、平成 19 年 5 月 14 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

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

Multiplex PCR Assay Kit 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) RV-A, RV-C の検出

RNA 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、RV-A ; Beg9/End9 (Gouvea et al, J Clin Microvirol, 28 : 1990)、RV-C ; G8S/G8NA2 (葛谷ら, 感染症学雑誌, 77 : 2003) を使用した。

増幅産物については、ダイレクトシーケンス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、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、①1st ; SV-F13, F14/SV-R13, R14, nested ; F22/R2 (Okada et al, Arch Virol, 151 : 2006)、②1st ; F11/R1, nested ; F21/R2 (Okada et al, Arch Virol, 147 : 2002)、③ 1st ; SaV124F, 1F, 5F/SV-R13, R14, nested ; 1245Rfwd/R2 (Kitajima et al, Appl Environ Microbiol, 76 : 2010) の 3 組のプライマーを用いた nested PCR を実施し、いずれかで SaV 遺伝子が増幅された検体を SaV 陽性と判定した。

4. 二枚貝からのウイルス遺伝子の検出

中腸腺 1 個分を 1 検体とし、RNA 抽出材料の作製方法として①10%乳剤に 10ml 当たり 25mg の α -アミラーゼ (和光純薬) を添加し、37°C 1 時間の処理の後、ポリエチレングリコール (PEG) 沈殿法により濃縮を行う方法 (以下 PEG 濃縮法) と、② α -アミラーゼ処理した 50%乳剤の遠心上清を直接 RNA 抽出に使用する方法 (以下 50%乳剤法) の 2 種類を用いた。RNA 抽出から cDNA 合成までは糞便検体と同じ方法を用い、Nested PCR により各ウイルスの遺伝子の増幅を試みた。使用プライマーは以下の通りである。NoV は厚生労働省通知法のとおり。SaV は 1st ; SaV124F, 1F, 5F/SV-R13, R14, nested ;

1245Rfwd/R2 。 AstV は 1st ; PreCAP1/AC230, nested ; AC1' /AC230。AiV は 1st ; C(+)/C(-)、nested ; C94b/264k (Yamashita et al, 前掲)。RV-A は 1st ; Beg9/End9, nested ; Beg9/7innerR (5'-GGRTTACATAACCAYTCATT-3'), 7innerR2 (5'-GGATTGCACAGCCATTCRTT-3')。RV-C は 1st ; G8S/G8A, nested : G8S/G8NA2 (葛谷ら, 前掲)。AdV は 1st ; AdnTU7/AdnU4' (Shimada et al, J Clin Microbiol, 42 : 2004)、nested ; AdnU-S'2/AdnU-A2。PeV は 1st ; ev22+/HPV-N1 (Ito et al, J Gen Virol, 85 : 2004)、nested ; ev22+/ev22-。HEV は ① 1st ; HE7-1, 2/HE7-3, 4, nested ; HE7-5, 6, 7/HE7-8, 9 (Takahashi et al, Intervirology, 46 : 2003)、② 1st ; HE044/HE040, nested ; HE110-2 /HE041 (Mizuo et al, J Clin Microbiol, 40 : 2002)。HAV は、厚生労働省通知の方法 (食安監発 1201 第 2 号、平成 21 年 12 月 1 日) に従い 1st に HAV+2799/HAV-3273、nested に HAV+2907/HAV-3162 を使用した。

増幅産物については、ダイレクトシーケンス法または TOPO TA Cloning Kit for Sequencing (invitrogen) を用いたクローニング法 (10 クローンずつ選択) 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。

5. 遺伝子型の同定

NoV, SaV, AstV, AiV, RV, AdV については系統樹解析により遺伝子型別を行った。NoV, AiV, RV, AdV は検出用 PCR の増幅産物、SaV は前述①、②、③のいずれ

かの増幅産物の塩基配列を解析に使用した。AstVは、糞便はAC4/AC6及びS4/AC6によるOne Step PCR、二枚貝は①1st ; AC4/AC6、nested ; AC4/End、②1st ; S4/AC6、nested ; S4/EndによるOne Step nested PCRを実施し、この領域の塩基配列を型別に使用した(S4, END ; Sakamoto et al, J Med Virol, 61 : 2000、AC4, AC6, AC1' ; Sakon et al, J Med Virol, 61 : 2000)。

(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、北海道立衛生研究所ヒトを対象とする医学研究に関する規定に基づいて審査を受け、非該当と判定された。

C. 研究結果

1. 二枚貝喫食事例

二枚貝の喫食がみられた食中毒疑い事例のウイルス検索結果を表1に示した。5事例ともに患者糞便からNoVが検出され、いずれもGenogroup(G)IとGIIの両方を含む複数の遺伝子型が確認された。事例No.1,2,4,5の4事例では、検査検体の半数以上からNoVが検出された。また、事例No.1の1検体ではNoV, SaV, AiV、事例No.2の1検体ではNoV, AiVが検出された。事例No.3のNoV陽性率は50%以下(3/7)であったが、NoV陰性の1検体からAstVが検出され、胃腸炎ウイルスの陽性率は50%を上回った。

No.3,4,5の3事例については関連する二枚貝が確保できたため、糞便と同様に各種腸管系ウイルスの検索を行った。こ

の3事例について、患者糞便及び二枚貝のウイルス検索結果を表2~4に示した。二枚貝の中腸腺の前処理はPEG濃縮法と50%乳剤法の2種類を使用し、それぞれの結果を分けて示した。

表2は二枚貝喫食事例No.3の検査結果である。喫食二枚貝は中国産の冷凍アサリで、患者に提供されたアサリと同一海域産の別ロット品について検査を行った。糞便、アサリともに最も検出率が高かったのはNoVであり、検出遺伝子型は、患者はGI.4, GI.8, GII.12, GII.15、アサリはPEG濃縮法と50%乳剤法の両方でGI.4, GII.2, GII.15、PEG濃縮法のみでGI.3, GI.8、50%乳剤法のみでGII.12であった。アサリからのNoVの検出率については、PEG濃縮法と50%乳剤法で大きな違いは見られなかった。検出NoVの塩基配列(nested PCR産物のプライマー間)を比較したところ、患者No.1とアサリNo.8のGI.4株、患者No.6とアサリNo.5のGI.8株、患者No.4,6とアサリNo.10,12,15のGII.15株の塩基配列がそれぞれ100%一致した。それ以外の株は、同じ遺伝子型であっても塩基配列は1~数塩基異なっていた。NoV以外のウイルスについては、患者糞便からはAstV(type3)が、アサリからはPEG濃縮法でSaV(GV)とRV-A(G1)が検出され、検出されたウイルスは両方で一致しなかった。

表3は、二枚貝喫食事例No.4のウイルス検索結果である。この事例ではホタテの稚貝が中腸腺(通称ウロ)ごと生で提供されており、その残品を入手することができた。患者糞便から検出されたウイル

スは NoV のみであり、2 検体から GII. 13 が、1 検体から GI. 14 が検出された。ホタテについては、PEG 濃縮法では 8 検体中 1 検体から NoV の GII. 6 が検出された。50%乳剤法では 2 検体から NoV が検出され、遺伝子型は GII. 2 と GII. 13 であった。患者 No. 1, 3 とホタテ No. 13 から検出された GII. 13 株の塩基配列は 100%一致した。NoV の検出率がやや高かった 50%乳剤法の検体についてのみ、その他のウイルスの検索も行ったところ、AiV(genotypeB) と AstV(型別領域が増幅できなかったため型不明)が検出された。

表 4 に、二枚貝喫食事例 No. 5 のウイルス検索結果を示した。この事例ではカキフライが提供されており、その材料である中国産冷凍カキフライの同一ロット品と調理済みのカキフライ残品について検査を行った。患者からは NoV のみが検出され、遺伝子型は GI. 12, GII. 2, GII. 6 であった。カキの NoV 検査では、PEG 濃縮法を用いた調理済みのカキフライから GII. 14 が、調理前のカキフライから GII. 6 と GII. 9 が検出された。50%乳剤法では調理前のカキフライのみを使用し、GII. 6 と GII. 11 が検出された。患者 No. 2 とカキ No. 5, 8, 15 から検出された GII. 6 株の塩基配列は 100%一致した。PEG 濃縮法と 50%乳剤法での NoV 検出率に差がなかったため、調理前のカキフライ 8 個を用いていた 50%乳剤法の検体についてのみ他のウイルスの検索を行ったところ、AiV(genotypeA) と AstV(型不明)が検出された。

2. 非二枚貝関連の食中毒疑い事例

二枚貝の関与のみられなかった食中毒

疑い事例 64 事例についてウイルス検索を行ったところ、61 事例からウイルスが検出された。このうち 47 事例からは NoV が単独で検出され、その塩基配列は同一事例内でそれぞれ 100%一致した。14 事例では NoV 以外のウイルスの関与がみられた。表 5 に示すとおり、14 事例中 12 事例については主に NoV が検出され、一部の検体から他のウイルスの検出もみられた。SaV が検出された患者の年齢は、単独検出例が 7, 23, 31 歳、NoV も検出されたものが 1, 9, 20 歳であった。AiV と PeV 検出例はすべて NoV も検出されており、それぞれ 5, 55, 59 歳と 1 歳であった。AdV 検出例もすべて NoV が検出されており、事例 No. 7 の 1 検体のみ F 種(感染性胃腸炎タイプ)の 41 型が検出され、年齢は 30 歳、他は C 種(急性呼吸器疾患タイプ)が検出され、5, 23, 31 歳であった。RV-C は単独検出で、30 歳であった。NoV が検出されなかった 2 事例のうち、事例 No. 13 では、年齢が 20-50 代の患者から得られた 6 検体すべてから RV-A(G1)が検出された。事例 No. 1~13 において検出された NoV と RV-A の塩基配列は、同一事例内ではそれぞれ 100%一致した。事例 No. 14 は、2 歳児由来の 1 検体から AdV(C 種)が検出されたのみであり、病因物質の特定はできなかった。

3. 感染症疑い事例

中学生以上の年齢層の感染症疑い事例 47 事例についてウイルス検索を行った。表 6 に示すとおり、なんらかのウイルスが検出された事例は 38 事例あり、このうち 31 事例(82%)からは NoV のみが検出された。NoV が主に検出され一部検体から

他のウイルス(SaV, AdV)が検出された事例が4事例あり、SaV単独検出例の年齢は26, 33, 36歳、NoVとAdV(C種)の検出例は39歳、SaVとAdV(A種, 31型: 感染性胃腸炎タイプ)の検出例は30歳であった。また、SaVのみ検出された事例が中学校で1事例、知的障害者施設で2事例確認された。知的障害者施設におけるSaV検出患者の年齢は、40-50代と40-70代であった。

D. 考察

二枚貝の喫食がみられた事例と二枚貝を介さない事例に分けて、NoVを含めた種々の胃腸炎ウイルスの集団胃腸炎事例への関与の実態について調査を行った。

二枚貝喫食事例の患者糞便におけるウイルス検索では、NoVは5事例すべてから検出され、いずれの事例も複数の遺伝子型の関与が確認された。また、このうち3事例において、患者糞便それぞれ1検体からNoV以外のウイルスが検出された。検出されたウイルスの種類や遺伝子型の組み合わせは、同一事例内の糞便検体でも様々であった。NoV以外のウイルスが検出された3例のうち2例はNoVなどとの混合感染(NoV+SaV+AiVとNoV+AiV)であった。AstVの単独検出が1例認められ、この患者はAstVの感染により胃腸炎を発症したと考えられた。また、このAstVが検出された事例のNoV陽性率は50%以下であったが、AstV単独検出例を加えることで胃腸炎ウイルス陽性率は50%を上回った。このように、NoV以外のウイルスの単独感染による患者が含まれている可能性があることから、NoVの検出率が低い二枚

貝喫食事例については、SaV, AiV, AstVなどのNoV以外のウイルスの検索を行うことが望ましい。

二枚貝の喫食のみみられた5事例のうち3事例については、二枚貝(アサリ、ホタテ、カキフライ)のウイルス検索も行った。いずれの二枚貝もNoVを含む数種類のウイルスが検出され、NoVについては複数の遺伝子型が確認された。検出されたウイルスの種類や遺伝子型の組み合わせは、同一ロットの二枚貝でも様々であった。アサリとカキフライについてはPEG濃縮法と50%乳剤法のどちらの方法を使った場合でもNoVについての検出率は高く、どちらの8検体についても、検出されたNoV株の一部については患者から検出されたNoV株の一部と遺伝子型および塩基配列が一致した。しかしホタテにおいては、PEG濃縮法では8検体中1検体からNoVが検出されたのみで、検出遺伝子型は患者から検出されたNoV株と一致しなかった。50%乳剤法を用いた追加検査を行ったところ、処理法の違いによるものか検体数を追加したことによるものかは不明であるが、患者と同じ遺伝子型のNoVが1検体から検出され、塩基配列も一致した。一方NoV以外のウイルスについては、患者と二枚貝からの検出状況が3事例とも一致しなかった。患者と二枚貝から検出されたウイルスの一致率が低い場合は原因食品かどうかの判断が難しいため、二枚貝についての適切な検査法や検査数の模索が必要であると考えられた。また、その一方で、患者と原因推定食品から検出されたウイルスの一致不一致をどの程度重視するかについても検討が必

要である。検出ウイルスが単一の事例であれば、二枚貝関連事例であっても検出ウイルスの型(塩基配列)が一致することを確認する必要がある。しかしながら、患者や二枚貝から複数のウイルスや遺伝子型が検出され、その組み合わせも検体により様々であるような事例の場合、原因二枚貝であっても検出ウイルスが患者と一致しないケースが想定される。一致しない場合の判断材料となるよう、二枚貝関連事例の実態調査のデータをさらに集積し、その情報を保健所等に還元する必要がある。

非二枚貝関連の食中毒疑い事例と中学生以上の年齢層の感染症疑い事例では、「NoV 単独検出事例」と「NoV が主に検出され一部検体から他のウイルスも検出された事例」を合わせると、NoV による事例がそれぞれ 97%、92%と大多数を占めた。一方で、食中毒疑い事例で RV-A、感染症疑い事例で SaV の単独感染による集団胃腸炎事例が確認された。このことから、食中毒起因ウイルスとしてのリスクが NoV の次に高いのは RV-A と SaV であると考えられた。また、食中毒疑い事例と感染症疑い事例では、NoV の集団感染事例に紛れ込んだ散発感染例と推測される、成人年齢層の SaV, AiV, AdV, RV-C 感染例が確認された。AdV は、感染性胃腸炎の原因となる 31 型と 41 型が検出された。AiV, AdV, RV-C が単独で成人の胃腸炎集団発生や食中毒の原因となり得るかについては不明であり、さらにデータを収集して検討を行う必要がある。

E. 結論

- ・二枚貝喫食事例の患者糞便についてウイルス検索を行ったところ、すべての事例において NoV が検出された。NoV 以外のウイルスでは、SaV, AiV, AstV が検出された。このうち AstV は単独で検出され、胃腸炎発症の原因であったと考えられた。
- ・患者と原因疑い食品の二枚貝から検出されたウイルスは、NoV については一部の株の塩基配列が一致したが、一致しない NoV 遺伝子型やウイルスが多数認められた。
- ・二枚貝の関与がない食中毒疑いおよび感染症疑い事例では、NoV が主な原因ウイルスと考えられる事例が大多数を占めるなか、SaV と RV-A の単独感染事例がそれぞれ 3 事例と 1 事例確認された。NoV に次いで成人の集団胃腸炎(食中毒を含む)の起因ウイルスとなるリスクが高いウイルスと考えられた。

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

表1 二枚貝喫食事例の患者糞便についてのウイルス検索結果

事例No.	喫食二枚貝	糞便検査数	検出検体数(遺伝子型)			
			NoV	SaV	AiV	AstV
1	カキ(生) [※]	2	2 (GI.1, 4, 7, GII.2, 13)	1 (GI.3) *	1 (typeA) *	-
2	カキ(熱)	5	5 (GI.9, GII.4)	-	1 (typeA) *	-
3	アサリ(熱)	7	3 (GI.4, 8, GII.12, 15)	-	-	1 (type3)
4	ホタテ(生)	4	3 (GI.14, GII.13)	-	-	-
5	カキ(熱)	6	3 (GI.12, GII.2, 6)	-	-	-

※ 生:生食、熱:加熱して喫食

* NoVも検出

網掛け:検査検体の半数以上から検出されたウイルス

表2 二枚貝及び喫食患者からのウイルス検出状況(二枚貝喫食事例 No.3)

検体	NoV		SaV	AiV	AstV	RV-A	RV-C	AdV	PeV	HAV	HEV
	GI	GI									
患者糞便	1	GI.4	GI.12	-	-	-	-	-	-	NT	NT
	2	-	-	-	-	type3	-	-	-	NT	NT
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	NT	NT
	4	GI.4	GI.15	-	-	-	-	-	-	NT	NT
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	NT	NT
	6	GI.8	GI.15	-	-	-	-	-	-	NT	NT
	7	-	-	-	-	-	-	-	-	NT	NT
アサリ	PEG濃縮	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		2	GI.4	-	-	-	-	-	-	-	-
		3	GI.3	GI.2, 15	GV	-	-	-	-	-	-
		4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		5	GI.8	GI.2	-	-	-	G1	-	-	-
		6	-	GI.15	-	-	-	-	-	-	-
		7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		8	GI.4	GI.15	-	-	-	-	-	-	-
	50%乳剤	9	GI.5	GI.12	-	-	-	-	-	-	-
		10	-	GI.15	-	-	-	-	-	-	-
		11	-	GI.2	-	-	-	-	-	-	-
		12	-	GI.15	-	-	-	-	-	-	-
		13	GI.5	-	-	-	-	-	-	-	-
		14	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		15	GI.4	GI.15	-	-	-	-	-	-	-
		16	-	-	-	-	-	-	-	-	-

NT: not tested