

201327036A

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検出法に関する研究

平成25年度 総括・研究分担報告書

研究代表者 野田 衛

平成26(2014)年 3月

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検出法に関する研究

平成 25 年度 総括・研究分担報告書

研究代表者 野田 衛

平成 26 (2014) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告書

食品中の病原ウイルスの検出法に関する研究

野田 衛 ----- 3

II. 研究分担報告書

1. 研究協力者総括報告

田中 智之 他 ----- 25

2. 食品からのウイルス検出法としてのパンソルビン・トラップ法の
精度向上に関する研究

斎藤 博之 他 ----- 31

3. 富山県におけるノロウイルス・サポウイルス検出状況及び
次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子検査の試み

名古屋 真弓 他 ----- 59

4. 網羅的ゲノム解析によるノロウイルスの分析法の検討

上間 匡 ----- 71

5. ウイルスの食品検査の精度管理

鈴木 達也 他 ----- 81

6. 市販カキの食品媒介性ウイルスの汚染調査および
検査法における課題の把握

野田 衛 他 ----- 101

III. 研究協力報告書

1. 2012-2013 シーズン、本邦におけるノロウイルス流行の分子疫学

本村 和嗣 他 ----- 115

2. 市販カキからの腸管系ウイルスの検出

吉澄 志磨 他 ----- 121

3. 市販カキのノロウイルス等の汚染実態調査

三上 稔之 他 ----- 127

4. 2013年2月に購入した生カキからのノロウイルス・サポウイルスの
検出状況

田村 務 他 ----- 133

5. 集団胃腸炎事例から検出されたノロウイルスの分子疫学的解析および
国産市販生カキのウイルス汚染調査

入谷 展弘 他 ----- 141

6. カキにおけるノロウイルス遺伝子検出法の比較及び検出ウイルスの
遺伝子型について

重本 直樹 他 ----- 147

7. 市販生カキからの胃腸炎ウイルス検出状況

	山本美和子 他	-----	153
8.	2013年2月採取のカキからのノロウイルス検出		
	吉富 秀亮 他	-----	161
9.	下水および養殖カキからのノロウイルス検出		
	佐藤 直人 他	-----	167
10.	2013～2014シーズンに宮城県で検出されたノロウイルスの遺伝子型		
	植木 洋 他	-----	171
11.	食品の関与が推定される集団胃腸炎におけるウイルス検索		
	森 功次 他	-----	177
12.	愛知県におけるノロウイルス流行（2012/13シーズン）		
	小林 慎一 他	-----	183
13.	下水サンプルを用いた下痢症ウイルスの分子疫学的解析		
	三好 龍也 他	-----	189
14.	愛媛県におけるノロウイルス、サポウイルスの分子疫学的解析		
	山下 育孝 他	-----	195
15.	熊本県における集団及び散発下痢症由来ノロウイルスの疫学解析		
	原田 誠也 他	-----	207
IV.	研究成果の刊行に関する一覧	-----	219

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検出法に関する研究

平成 25 年度 総括研究報告書

研究代表者 野田 衛

平成 26 (2014) 年 3 月

平成 25 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検査法に関する研究」

総括研究報告

食品中の病原ウイルスの検査法に関する研究

研究代表者 野田 衛 国立医薬品食品衛生研究所・食品衛生管理部 第四室長

研究要旨

ウイルス性食中毒の検査体制の強化，高度化および標準化並びにウイルス性食中毒予防に必要な疫学データ等の蓄積等を目的として，(1)食品からのウイルス検出法および遺伝子解析法の開発，(2)変異株等早期検出のための食品・環境等のサーベイランス，(3)食品のウイルス検査の精度管理体制の確立に関する研究を実施し，以下の結果を得た。

(1) 食品からのウイルス検出法および遺伝子解析法の開発

食品からウイルス検出法の開発として，パンソルビン・トラップ法で得た濃縮検体の逆転写反応や PCR に使用する酵素や反応条件の最適化，DNase 処理やアミラーゼ処理の改善により，結果のばらつき要因の減弱化や高感度化など検査精度の向上が図れた。通知法の陽性判定基準(実測値 10 以上)に基づくリアルタイム PCR による検査では，偽陰性となる場合が多く，カキの安全性を確保することが困難である。網羅的ゲノム解析法のウイルス性食中毒調査等への適応法を確立するために，臨床材料を用いて基礎的な研究を実施した。PCR 産物を解析対象とした場合，効率的にノロウイルス遺伝子を検出し，解析可能であったが，検体から直接得た RNA を用いた場合はノロウイルス以外の遺伝子が多く含まれ，解析が困難であった。

(2) 変異株等早期検出のための食品・環境等のサーベイランス

20123 年 2 月採取カキ検体を中心とて，カキの食品媒介ウイルスの汚染調査を実施した。加熱調理用カキは生食用カキと比較して，検出率，汚染ウイルス量，汚染ウイルスの遺伝子型数等が高い傾向にあった。生食用カキの汚染率は採取海域により大きく異なった。2012/13 シーズンに流行した GII/4 2012 変異株が多く検出され流行シーズンにおけるカキへの蓄積が確認された。ヒトからの検出が少ないものやみられないものを含め多くの遺伝子型が検出された。サポウイルスは GI.2 が多く検出された。A 型肝炎ウイルスおよび E 型肝炎ウイルスは検出されなかった。ヒトでの流行ウイルスやそれらの環境中での挙動を把握し，食中毒予防対策に資するため，ヒト，下水，カキからノロウイルス等の検出を試みた。下水，カキ，ヒトから検出されるノロウイルス遺伝子型は大まかには一致するものの，GI.4 が多く検出されるなど，異なる傾向を示すことも認められた。アストロウイルス，アイチウイルスなどは，臨床検体からの検出

と比較して、下水検体から高頻度に検出された。2012/13 シーズンにおけるノロウイルスの主な流行株は GII/4 2012 変異株であった。GII/4 2012 変異株は ORF1 が GII.4_2007a, ORF2 と 3 の GII.4 のキメラウイルスであった。各地で発生した食中毒事例、散发性および集団胃腸炎から検出されたノロウイルス等について遺伝子解析を行い、流行ウイルスの遺伝子型、キメラウイルスの同定等を行い、流行株の性状把握を行った。2013/14 シーズンもノロウイルス GII/4 2012 変異株が主流であったが、それ以外の遺伝子型の占める割合が増加した。

(3) 食品のウイルス検査の精度管理体制の確立

糞便試料を用いたノロウイルス GII のリアルタイム PCR 検査の外部精度管理を 12 機関を対象に実施した。定量値のバラツキの要因として、各機関で使用している検量線作成用 cDNA 溶液の違いが影響している可能性が示唆された。一方、得られた測定値の対数変換値を用いて Xbar-R 管理図を採用することにより、精度管理の評価ができるものと考えられた。

研究分担者		林 志直	同上
田中 智之	堺市衛生研究所	入谷 展弘	大阪市立環境科学研究所
斎藤 博之	秋田県健康環境センター		
	一	山元 誠司	同上
名古屋 真弓	富山県衛生研究所	改田 厚	同上
鈴木 達也	財団法人食品薬品安全センター 秦野研究所	阿部 仁一郎	同上
		久保 英幸	同上
上間 匡	国立医薬品食品衛生研究所	田村 務	新潟県保健環境科学研究所
		山本 美和子	広島市衛生研究所
研究協力者		田中 寛子	同上
本村 和嗣	大阪大学微生物病研究所	藤井 慶樹	同上
		京塚 明美	同上
三好 龍也	堺市衛生研究所	石村 勝之	同上
内野 清子	同上	植木 洋	宮城県保健環境センター
岡山 文香	同上		一
芝田 有理	同上	木村 俊介	同上
吉田 永祥	同上	重本 直樹	広島県立総合技術研究所 保健環境センター
吉澄 志磨	北海道立衛生研究所		
森 功次	東京都健康安全研究センター	久常 有里	同上
		飯塚 節子	島根県保健環境科学研究所
宗村 佳子	同上		

山下 育孝	愛媛県立衛生環境研究所
青木 里美	同上
菅 美樹	同上
四宮 博人	同上
三上 稔之	青森県環境保健センター
筒井 理華	同上
東海林 彰	同上
古川 紗耶香	同上
稲崎 倫子	富山県衛生研究所
板持 雅恵	同上
嶋 一世	同上
堀元 栄詞	同上
小淵 正次	同上
滝澤 剛則	同上
佐藤 直人	岩手県環境保健研究センター
高橋 雅輝	同上
齋藤 幸一	同上
吉富 秀亮	福岡県保健環境研究所
吉山 千春	同上
世良 暢之	同上
小林 慎一	愛知県衛生研究所
原田 誠也	熊本県保健環境科学研究所
吉岡 健太	同上
岩切 章	宮崎県衛生環境研究所
秋野和華子	秋田県健康環境センター

(順不同)

A. 研究目的

ウイルス性食中毒は依然多発し近年はノロウイルス以外のウイルスによる事件も増加傾向にある。食中毒の原因究明や

食品のウイルス汚染実態の把握には食品のウイルス検出法の確立が必要であるが、汚染量が少ないこと等から困難な場合が多い。最近では遺伝子の変異し検出困難な事例も認められている。そのため原因食品、汚染経路等の迅速究明にはノロウイルス以外のウイルスの検出法や検出困難なウイルスを迅速に検出同定する技術が必要である。また、そのような変異株の出現を早期に探知し、被害拡大前にあらかじめ検査法を構築するためには食品や環境のウイルスサーベイランスが不可欠である。一方現在食品ウイルス検査は外部精度管理体制が確立されておらず信頼性が確保されていない。

以上の背景から、本研究班では、全国地方衛生研究所等の協力の下、ウイルス性食中毒の検査体制の強化、高度化および標準化並びにウイルス性食中毒予防に必要な疫学データ等の蓄積等を目的として、(1)食品からのウイルス検出法および遺伝子解析法の開発、(2)変異株等早期検出のための食品・環境等のサーベイランス、(3)食品のウイルス検査の精度管理体制の確立に関する研究を実施した。

B. 研究方法

1. 食品からのウイルス検出法および遺伝子解析法の開発

(1) パンソルビン・トラップ法の高精度化に向けた検討

パンソルビン・トラップ法による食品からのウイルス検出を行うにあたり、検査機関による結果のバラつきが生じやすい検査工程として、逆転写反応や PCR における酵素の種類と反応条件が想定され

ることから、それらの酵素の選定と最適化を検討した。 α -Amylase 粉末は用時調製使用が煩雑であり、また不溶性成分の残留が結果に影響を及ぼすと考えられたことから、その解決に向け検討を行った。DNase 処理の簡便化や RNA 定量値への影響の回避のための検討を行った。

(2) カキからのノロウイルス遺伝子検出法における検討

市販カキを用いて、nested PCR 法とリアルタイム PCR 法による検出率等を比較した。

(3) 網羅的ゲノム解析のウイルス性食中毒検査への適応に関する研究

2 機関において、異なる次世代シーケンサー (MiSeq および Ion PGM) を用いて、網羅的ゲノム解析のノロウイルス食中毒調査の適応に向けた基礎的な研究を実施した。患者便等の臨床材料から直接 RNA 抽出して得た RNA およびノロウイルス特異的 PCR 法で増幅して得た DNA の 2 種類を対象に網羅的ゲノム解析を行った。得られたリードを、専用のソフト等を用いて解析し、有用性を検討した。

2. 変異株等早期検出のための食品・環境等のサーベイランス

(1) カキにおける食品媒介ウイルスの汚染実態調査

市販カキ等を対象として、ノロウイルス、サポウイルス、A 型肝炎ウイルスおよび E 型肝炎ウイルス等の腸管系ウイルスの検索を実施した。

特に、2012/13 シーズンは GII/4 2012

変異株が大流行したことから、全国 8 地方衛生研究所の協力を得て、2013 年 2 月に市販カキ等を購入し、各種の食品媒介性ウイルスの検索を実施した。

(2) 下水等の食品媒介ウイルスの汚染実態調査

下水等を対象として、ノロウイルス、サポウイルス等の検索を実施し、ヒトの食中毒および胃腸炎散発例、集団発生事例から検出されたウイルスとの関連性等を分析した。

(3) 食品媒介事例等の疫学的研究および胃腸炎ウイルスのサーベイランス

これまでの研究での解析株を含め、計 382 の遺伝子型 GII/4 のノロウイルス株について、ORF2-3 全長の塩基配列を決定し、進化系統解析および立体構造解析を行った。また、全長ゲノム配列を決定した 20 株の GII/4 2012 変異株のゲノム構造を調べた。

食品媒介事例の発生要因等を明らかにし、予防対策に資するため、各地域で発生した食中毒、胃腸炎集団発生、散発例等からウイルス検出を行い、検出ウイルスの遺伝子解析を行うとともに、疫学的な解析を行った。

(検査対象ウイルス、検査法等の詳細は、各研究協力報告書参照)

3. 食品のウイルス検査の精度管理体制の確立

12 地方衛生研究所を対象として、共通試料を配布することにより外部精度管理を行った。陽性試料 2 種類、陰性試料 1 種

類および標準cDNA溶液を調査試料として配布し、ノロウイルスGIIのリアルタイムPCR法による定量検査を各検査機関で実施した後、得られたデータを回収後、解析した。検査方法は各検査機関で通常実施している方法と指定した共通の方法の2方法とし、検量線作成用cDNA溶液は各機関で通常使用しているcDNA溶液と配布した共通のcDNA溶液の2種類を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究にあたっては、試料提供者、その家族の人権、尊厳、利益が保護されるよう十分に配慮した。具体的には、各研究実施機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、また提供試料、個人情報情報を厳格に管理、保存した。そのデータについて個人が特定されないよう配慮した。動物実験に関しては「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」(平成18年6月1日通知)および「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン(日本学術会議)」(平成18年6月1日)の指針を踏まえつつ、動物実験が有効かつ適切に行われるよう配慮した。また感染研における「国立感染症研究所動物実験実施規程」(平成19年1月1日施行)に基づき、用いる動物の数は最小限とし、採血時には麻酔を施し動物愛護の精神のもとに実験を行った。

C. 研究結果

1. 食品からのウイルス検出法および遺伝子解析法の開発

(1) 食品からのウイルス検出法の開発

① パンソルビン・トラップ法の高精度化に向けた検討

α -Amylase 粉末に含まれる賦形剤が残留すると、検出感度に影響することから、これをあらかじめ除去した酵素液を調製したものを使用方法と粉末を用時調製する方法を比較した。その結果、両者は同等の効果があることが確認され、液化調製品は -20°C で2ヶ月以上安定保存できた。黄色ブドウ球菌由来 DNA を除去する方法として、RNA 抽出過程でのオンカラム DNase 処理と RNA 抽出後の易熱性 DNase 処理の2通りの方法を検討した。いずれの方法を用いても、これまでの DNase 処理で問題となったコピー数の低下は起こらなかった。逆転写反応は、 58°C での高温逆転写反応が非特異反応による感度低下を抑制するのに有効であった。PCR 反応は酵素製品の選択が重要で、特にホットスタート仕様が必須であることが確認された。以上の検討により、パンソルビン・トラップ法における結果のばらつきとなる要因の減弱化と高感度化など検査精度の向上が図れた。

(斎藤研究分担報告)

② カキからのノロウイルス遺伝子検出法の比較

市販カキを用いて、nested PCR 法とリアルタイム PCR 法で検査し、検出率を比較した。リアルタイム PCR において実測値10以上を陽性とした場合、nested PCR 法陽性、リアルタイム PCR 陰性と判定される検体が多く確認された。その傾向(リアルタイム PCR 陰性、nestedPCR 法陽性)は定量値の低い傾向にあるノロウイルス

GIにおいて顕著であった。リアルタイムPCR法陽性、nested PCR法陰性の検体は認められなかった。一方、リアルタイムPCRで定量値が得られた(0以上)ものを陽性と判定した場合、ノロウイルスの検出率は一致する傾向にあったが、リアルタイムPCR法陽性、nested PCR法陰性となる検体もあった。

(重本研究協力報告, 野田研究分担報告)

(2) 網羅的ゲノム解析のウイルス性食中毒検査への適応に関する研究

ノロウイルス陽性の患者便および嘔吐物4検体から直接抽出して得たRNAを対象として、MiSeqを用いて網羅的ゲノム解析を行った。全体で数十万のリード数が得られたが、ノロウイルスの配列は0~数千リード数と少なかった。しかし、一部の便検体から複数のノロウイルスの配列が検出された。嘔吐物からはノロウイルスの配列は検出されなかった。一方、PCR産物5検体についての解析では、各検体から百万程度のリード数が得られ、それぞれContigを作製後Blast解析したところ、半数以上はノロウイルスの配列であった。解読可能なORF2の配列を用いて解析した結果、各検体において複数のノロウイルス遺伝子型が検出された。

(名古屋研究分担報告)

ノロウイルス陽性患者便から直接得た総RNAおよびそれから精製して得たmRNAを用いてIon PGMで解析したところ、解析できた遺伝子のほぼ全てが大腸菌由来のものであった。本法は操作手順が多く煩雑であった。一方、PCR産物を対象とした解析では、全リード数46,147のうち

250塩基以上のリードが2,301得られ、そのうちの287リードがGII/4と一致した。PCR産物の精製を行ったにもかかわらず、200塩基以下のリードが多かった。GII/4と一致した287リードの一部をアライメント解析したところ、塩基の挿入、欠損など多くのバリエーションが確認された。系統樹解析で58クローン中48クローンが同一クラスターを形成した。本法はnested PCRまでは、従来のノロウイルスの遺伝子検査と同様の手順で実施でき、検体調整は比較的容易であった。

(上間研究分担報告書)

2. 変異株等早期検出のための食品・環境等のサーベイランス

(1) カキにおける食品媒介ウイルスの汚染実態調査

北海道において、2013年2月に購入した市販生カキについて調査した。生食用カキは、5海域6ロットのうち3ロットからノロウイルスが検出された。このうち1ロットの検出率は100%、すべての検体から複数の遺伝子型が確認され、またサボウイルス検出率も67%と高かった。他の2ロットの検出率は低かった。2海域2ロットの加熱用カキのノロウイルス陽性率は83%、50%と高く、いずれも複数の遺伝子型の蓄積が認められた。最も多く検出されたノロウイルス遺伝子型はGII/4 2012変異株であった。生食用カキ1検体からブタ型ノロウイルス(GII.18)が検出された。

(吉澄研究協力報告)

青森県において2013年3月に購入した市販カキ15検体について調査した結果、

ノロウイルス GI が 11 検体, GII が 12 検体, サポウイルスが 1 検体から検出され, A 型肝炎ウイルスと E 型肝炎ウイルスは検出されなかった。ノロウイルス遺伝子の定量値は GI が $9.5 \sim 3.17 \times 10^2$ コピー/g, GII が $4.20 \times 10^1 \sim 8.82 \times 10^2$ コピー/g に分布し, 個体差が認められた。遺伝子型別の結果, GI は 4 種類 (GI/1, 7, 11, 14), GII は 6 種類 (GII/4, 11, 12, 13, 14) に分類され, SaV は GI/2 であった。

(三上研究協力報告)

新潟県において, 2013 年 2 月に購入した生食用カキ 2 ロット, 加熱調理用カキ 4 ロットについてノロウイルスとサポウイルスの検出を試みた。その結果, 全てのロットからノロウイルス GII が検出され, このうち 5 ロットから GII/4 2012 変異株が検出された。また, ノロウイルス GI が生食用 1 ロット, 加熱調理用 3 ロットから, サポウイルスは加熱調理用 3 ロットから検出された。検出率は加熱調理用が高かった。

(田村研究協力報告)

広島県において, 市販カキからのノロウイルスの検出を試みた。陽性例の定量値では GI は $6.7 \times 10^1 \sim 7.7 \times 10^2$, GII は $1.4 \times 10^2 \sim 1.5 \times 10^4$ に分布し, 平均で約 20 倍 GII の定量値が高い傾向を示した。

検出されたノロウイルスの遺伝子型は, GI/4, GI/6, GII/4 など感染性胃腸炎患者からもよく検出される遺伝子型が多かったが, GII/11 のように稀な型も検出された。

(重本研究協力報告)

広島市において, 2013 年 2 月に購入した市販生カキ 5 ロット 15 検体についてノ

ロウイルス, サポウイルス, A 型肝炎ウイルス, E 型肝炎ウイルス, アストロウイルス, アデノウイルス, パレコウイルス, エンテロウイルスの検索を行った。ノロウイルスが最も多く 4 ロット 8 検体, 次いでアストロウイルスが 3 ロット 5 検体, サポウイルスが 2 ロット 4 検体, アデノウイルスが 1 ロット 1 検体から検出された。ノロウイルス GII/4 陽性例について系統樹解析したところ, 全て GII/4 2012 変異株であった。

(山本研究協力報告)

福岡県において, 2013 年 2 月に購入した市販カキの中腸腺に含まれるノロウイルスの定量と遺伝子型の決定を行った。その結果, 6 ロット中 5 ロットからノロウイルス遺伝子が検出され, 中腸腺 1g 当たりに含まれる定量値は最少 71 コピー, 最大 3,071 コピーであった。ノロウイルスの遺伝子型は, GI は GI/4 の 1 種類, GII は GII/2, GII/4, GII/6, GII/11, GII/12, GII/13 および GII/14 の 7 種類に分類された。GII/4 はすべて GII/4 2012 変異株であった。

(吉富研究協力報告)

大阪市において, 国産市販生カキ 11 ロットについてノロウイルス, サポウイルス, A 型肝炎ウイルスおよび E 型肝炎ウイルスの検索を行った。2 ロットからウイルスが検出され, 1 ロット (2013 年 2 月採取) はノロウイルスのみで遺伝子型は GII/4, 他の 1 ロット (2013 年 12 月採取) からはノロウイルスおよびサポウイルスが検出され, 遺伝子型はそれぞれ GII/6 および GII/1 であった。A 型肝炎ウイルスおよび E 型肝炎ウイルスは検出されなかった

(入谷研究協力報告)

(2) 下水等の食品媒介ウイルスの汚染実態調査

富山県において、2013年1月～12月に、感染性胃腸炎患者、下水流入水、岩ガキからノロウイルスおよびサポウイルスの検出を行った。患者からノロウイルス GII.4, GII.12, サポウイルス GI.1, GI.2 などが、下水流入水からノロウイルス GII.4, GI.4, サポウイルス GI.1 などが、岩ガキからノロウイルス GI.4, GII.4, GII.13 が検出された。2013年のノロウイルスは例年と同様に遺伝子型 GII.4 が主流であり、中でも2012変異株が多くを占めた。

(名古屋研究分担報告)

岩手県において、2013年10月～2014年1月に、県内のA湾に隣接する下水処理施設の流入水・放流水およびA湾産の養殖カキからノロウイルス遺伝子の検出を試みた。その結果、流入水および放流水のいずれからもノロウイルスGIおよびGIIが検出され、当該下水処理施設におけるノロウイルスの除去率はおよそ10～10²オーダーであった。養殖カキからは、1月にノロウイルスGIIが検出されたが、検出に養殖海域や水深による違いはみられなかった。

(佐藤研究協力報告)

宮城県において、2013～2014シーズンを中心に、ヒト、カキおよび下水からノロウイルスを検出し、分子疫学的解析を行った結果、GIではカキ検体でGI.4(28%)、下水検体でGI.6(19%)が多く、GIIではヒト、カキ、下水でGII.4がそれぞれ47%

12%、14%を占めた。

(植木研究協力報告)

(3) 食品媒介事例等の疫学的研究および胃腸炎ウイルスのサーベイランス

2012/13シーズン流行したノロウイルスGII/4のORF2-3領域について系統樹解析を行なった。同シーズンのGII/4は、2006b, 2009a (New_Orleans 2009), 2012の3種類の変異株が流行し、2012変異株が主流であった。GII/4 2012変異株は、抗原エピトープAからEの領域を2006bと比較すると、6箇所に変異が認められた。全長ゲノム構造解析の結果、2012変異株はキメラウイルスで、ORF1がGII.4 2007a, ORF2とORF3はGII.4であった。

(本村研究協力報告)

大阪市において2013年4月～12月に発生した集団胃腸炎のうち39事例からノロウイルスが検出された。2013/14シーズンのノロウイルス胃腸炎は9月以降発生が認められ、12月に急増した。検出ノロウイルス遺伝子型は少なくとも9種類(GI:4種類, GII:5種類)認められ、GII/4が最も多く、次いでGII/13であった。GII/4株はすべて2012変異株であった。

(入谷研究協力報告)

東京都において、2013年1月～12月に発生した胃腸炎439事例について検索したところ、ウイルス検出事例数は232事例(52.8%)で、そのうちノロウイルスは209事例、その他のウイルスは24事例から検出された。2011年以降検出が増加しているサポウイルスGI.2の構造たんぱく質領域(VP1領域)に継続的なアミノ酸変異がみられた。サポウイルスの不顕性感

染者と発症者においてノロウイルスと同様に糞便中のウイルス量に差がみられないことが確認された。

(森研究協力報告)

愛知県において 2012/13 シーズンに散发性感染性胃腸炎患者から採取された糞便 300 検体のうち、116 検体 (38.7%) からノロウイルスが検出され、GII が 115 検体 (99.1%) で大半を占めた。系統樹解析で、GI は 1 遺伝子型 (GI.7) に、GII は 6 遺伝子型に型別され、GII.4 が GII の 69.0% と多くを占めた。GII.4 は 2004, 2006b, 2008a, 2009a, 2012 の 5 変異株に分類され、その 82.5% を 2012 変異株が占めた。胃腸炎集団発生 15 事例のうち 13 事例から GII.4 2012 変異株が検出された。

(小林研究協力報告)

堺市において、散发・集団感染事例の胃腸炎患者由来の臨床検体と下水由来の環境検体から下痢症ウイルスの遺伝子検出を行い、分子疫学的に解析した。ノロウイルスは、下水中の遺伝子量が流行期である冬季に増加し、臨床検体から検出された遺伝子型のほとんどが下水中からも検出された。サポウイルス、アストロウイルス、アイチウイルスは、臨床検体からの検出は少数であったが、下水検体からは高頻度で検出されたことから、感染性胃腸炎として顕在化しないウイルスの流行があったことが示唆された。

(三好研究協力報告)

愛媛県において、2013 年 1 月～12 月に発生した散发性胃腸炎の原因ウイルスとして、GII.2 を中心としてノロウイルスが最も多く関与したが、サポウイルスも比較的多く関与していた。集団発生 18 事例

では、11 事例からノロウイルスが検出された。そのうちの食中毒 9 事例中 7 事例から GII.4 が検出された。調理従事者に胃腸炎症状がみられた 1 事例を除き、すべて不顕性感染の調理従事者による食品汚染が原因と考えられた。GII.2 は、2010 年～2012 年の流行株と同様にキメラウイルスであり、GII.4 は 2012 変異株であった。

(山下研究協力報告)

熊本県において、2012 年 9 月～2013 年 12 月に発生した集団及び散发下痢症事例について下痢症ウイルスの検索を行った。ノロウイルスが原因判明事例の 91.7%、散发下痢症の 56.3% を占めた。ノロウイルスの遺伝子型は集団事例、散发事例とも GII/4 が多く、GII/4 の 92.8% が 2012 変異株であった。

(原田研究協力報告)

3. 食品のウイルス検査の精度管理体制の確立

12 機関を対象とした試行的外部精度管理において、陰性試料については全ての検査機関で正しい結果を報告した。一方、陽性試料については採用されている検査方法や検量線作成時の cDNA 溶液の違いにより、平均に有意差は認められなかったものの、その変動については試料により程度の差はあるが、差異が認められる傾向にあった。この要因として、使用する cDNA 溶液の違いが影響している可能性が考えられた。また、標準 cDNA 溶液の定量値は、共通の検査方法と比較して通常採用されている検査方法で得られる値の変動が大きかった。

(鈴木研究分担報告)

D. 考察

1. 食品からのウイルス検出法の開発・標準化食品からのウイルス検出法および遺伝子解析法の開発

(1) パンソルビン・トラップ法の高精度化に向けた検討

本研究により、①パントラ法に添加する α -Amylase はあらかじめ液化調製したものをを用いることで検査の簡便化と賦形剤混入に伴うトラブル防止を図れることができる、②黄色ブドウ球菌の DNA 除去には、RNA の分解・減少が起こらない RNA 抽出時のオンカラム DNase I 処理または抽出後の易熱性 DNase 処理が有効である、③逆転写反応は、黄色ブドウ球菌由来の RNA (16s リボソーム) に対する非特異反応を抑制できる、58℃の高温の反応が有効である、④PCR の反応系を適切に選択 (酵素の種類、ホットスタート仕様、Mg 濃度) することで、増幅効率を最適化でき、将来的な偽陽性対策の布石として dUTP を用いることができる、ことが示された。本法が有効に活用されるためには、適切な食品サンプルの確保が重要であり、実際に食卓に供せられる段階の検食 (調理から盛り付けのプロセスを経たもの) を保存するという原則を、事業者に周知する必要がある。また、検体に供した食品検体部分にウイルスが付着していなければ陰性となるため、サンプリングプランやスケールアップの方法についても検討する必要がある (斎藤研究分担報告)。

② カキからのノロウイルス遺伝子検出法における検討

通知法の陽性判定基準 (実測値 10 以上) に基づくリアルタイム PCR による検査では、偽陰性となる場合が多く、カキの安全性を確保することが困難であることが示された。陽性判定基準を下げると、リアルタイム PCR 法と nested PCR 法との結果の一致率は上昇するものの、リアルタイム PCR 法で偽陽性となる可能性も否定できない。また、「食品のウイルス検査に関する精度管理 (鈴木研究分担報告)」に記載されているように、検査機関ごとの定量値にバラつきが認められることから、実測値 10 以上を陽性と判断すること自体にも問題点がある。これらのことから、リアルタイム PCR 法で検査を行う場合、①実測値 10 以上を示した場合は陽性、実測値 10 以下の定量値が得られた検体については判定保留として、nested PCR 法で再検査を行う、②通常のコンベンショナル PCR 法による増幅産物を鋳型 DNA としてリアルタイム PCR 法を行う nested リアルタイム PCR 法で実施するなどの対応が、カキの安全性を確保する上で望まれると考えられる。

(2) 網羅的ゲノム解析のウイルス性食中毒検査への適応に関する研究

食中毒調査において、患者と従業員、食品、環境等から検出されたウイルスの遺伝子型が一致せず、それらの疫学的関連性が不明な事例がみられ、特に、カキ等の二枚貝関連事例で問題となっている。これは、現在の方法では、検体に多く含まれていた、一部の遺伝子型のウイルスしか検出できないという検査上の問題点に起因するが多いと考えられる。そ

ここで、これらの事例において網羅的ゲノム解析法の応用を可能とするため、2機関で異なる次世代シーケンサーを用いて基礎的研究を実施した。Miseq あるいは Ion PGM を用いた、PCR 増幅産物を対象とする網羅的ゲノム解析により、同一検体中に複数の遺伝子型のノロウイルスの配列や種々の欠損・挿入を持つ多様なノロウイルスの塩基配列が得られた。このことから、同一検体中に少数含まれる多様なウイルス配列の検出に PCR 産物を対象とした次世代シーケンサーの使用は有効であると考えられた。一方患者便や嘔吐物から直接得た RNA から遺伝子解析を行う場合は、ノロウイルス以外の配列が得られる場合が多かった。そのため、検体から得た RNA を対象とする場合、検体の処理の工夫の他、膨大なデータの中からウイルスの配列を抽出し解析する必要があるため、高性能のコンピューターと解析ソフト、解析手技の整備が必要であると考えられた(名古屋研究分担報告、上間研究分担報告)。

2. 変異株等早期検出のための食品・環境等のサーベイランス

(1) カキにおける食品媒介ウイルスの汚染実態調査

カキのウイルス汚染状況の把握を目的として、食品媒介ウイルスとして重要なノロウイルス、サポウイルス、A型肝炎ウイルスおよびE型肝炎ウイルスNoVなど4種類の腸管系ウイルスについて検索を行った。今回は2012/13シーズンにGII/4 Sydney2012変異株が大流行を引き起こしたことから、カキへの蓄積が想定された

ため、2013年2月に9自治体で市販カキを購入し、その汚染実態を調べた。その結果、多くのカキ検体からGII/4 2012変異株が検出され、カキへの蓄積が確認されるとともに、カキを原因食品とする食中毒のリスクが発生する可能性が示唆された(野田研究分担報告、吉澄、三上、田村、入谷、重本、山本、吉富研究協力報告)。

一方、GII/4 2012変異株以外にも数多くのノロウイルス遺伝子型がカキから検出された。その多くはヒトの食中毒患者や感染性胃腸炎患者から検出される遺伝子型であったが、ヒトの臨床検体からは検出されない遺伝子型も検出された。従来下水の調査から指摘されているように、遺伝子群GIのノロウイルスはヒトの臨床検体と比較して、下水やカキ等の二枚貝から検出される割合が相対的に高い。その原因として、軽症例を含め不顕性感染の起こしやすさが関連している他、組織血液型抗原との結合性を含め二枚貝における蓄積効率の違い、環境中での生存性の違い等が考えられ、今後の詳細な検討が必要である。

ダイレクトシーケンス法では決定できないケースがみられるようにカキには地域で流行しているウイルスが蓄積されているため、波形が混合しシーケンスできない株や汚染量が少ないなどの理由で、十分な増幅産物が得られずシーケンス解析対象となっていないウイルスが数多く存在していると考えられる。網羅的ゲノム解析等の応用が期待される。

従来から、カキから動物由来と考えられるノロウイルスや遺伝子群/型不明の

ノロウイルスが検出されることが報告されていた。今回も、今回カキからブタ型のノロウイルスが検出された（吉澄研究協力報告）。これらのウイルスのヒトの健康被害への関与は現時点では不明である一方、カキ等の二枚貝のウイルスのリスク評価やリスク管理をより正確に行うためには、ヒト型以外のノロウイルスの検出状況や汚染量等についてのデータの蓄積が必要である。

カキ中のノロウイルスの定量値を測定した結果、GI より GII が高い傾向にあった（三上、田村、重本、吉富研究協力報告）。この結果は下水中のノロウイルス遺伝子の定量結果とも一致しており、ヒトでの流行状況の程度をある程度反映しているものと考えられる。

また今回解析対象としたカキの多くはノロウイルスの流行期である 2 月であったことから、多くの検体からノロウイルスが検出された。カキ等の正確な汚染率等を調べるためには、シーズンを通しての、経年的な調査が必要である。

サポウイルスについては、型別された多くは遺伝子型 GI.2 に属した（田村、三上、田村、山本、吉澄研究協力報告）。ヒトや下水の調査結果（名古屋研究分担報告、山下、三好、森研究協力報告）からも示されるように、GI.2 の流行を反映しているものと考えられる。

その他の腸管系ウイルスとして、アストロウイルス、アデノウイルス、エンテロウイルスが検出され、ウイルスが蓄積されていることが示された（山本研究協力報告）。一方、食品媒介ウイルスとして重要な A 型肝炎ウイルスおよび E 型肝炎

ウイルスはいずれのカキ検体からも検出されなかった（野田研究分担報告、吉澄、三上、田村、入谷、重本、山本、吉富研究協力報告）。多くは 2 月採取検体であることから、一概には言えないが、両ウイルスの汚染リスクは高くないものと思われた。今後も同様の調査を継続し、データを蓄積する必要がある。

(2) 下水等の食品媒介ウイルスの汚染実態調査

岩手県の下水処理施設における放流水のノロウイルス遺伝子のコピー数は、流入水と比較して $10 \sim 10^2$ オーダー低い値であり、下水処理である程度除去されるものの、放流水からも検出された。養殖カキでは検出率が低く、養殖海域や垂下する水深による違いは確認されなかった。今後も調査を継続し、カキへのノロウイルスの蓄積状況を明らかにしていく必要がある（佐藤研究協力報告）。

宮城県における、ヒト、下水およびカキを対象とした調査で、検出される遺伝子型が、GI でヒトおよびカキ検体由来株と下水由来株との間で傾向が異なることや、GII においてヒト検体で比較的高頻度に検出されている GII.2、GII.6 がカキや下水検体からはほとんど検出されていないなどの特徴が認められた。これらの原因は不明であり、今後も調査の継続が必要である（植木研究協力報告）。

下水中のウイルスを検出することにより、不顕性感染を含め、ヒトで流行しているウイルスを網羅的に把握することができる。今後、採水時期、回数等について検討を行い、下痢症ウイルスの流行予

測の可能性についても検討を進める必要がある。また、同様のサーベイランスを行っている他の地方衛生研究所との情報共有システムを立ち上げるなど、前向きな発展が期待できる取り組みが望まれる(三好研究協力報告)。

(3) 食品媒介事例等の疫学的研究および胃腸炎ウイルスのサーベイランス

2006年以降の全国のノロウイルス GII/4 の全長ゲノム解析から、過去5シーズンにわたり、GII/4 2006b が主要流行株であることを明らかにしてきた。近年 GII/4 2006b の流行は減少しており、ヒト集団において、2006b に対する集団免疫が浸透していることが示唆される。2012 変異株は、抗原エピトープ A から E の領域に、2006b と比較して6箇所の特徴的変異が見つかったことから、抗原性が変化し、集団免疫から逃避できた可能性が高いことが示唆された(本村研究協力報告)。

大阪市において2013/14 シーズンも引き続き、GII/4 2012 変異株が主な流行株であることが確認された。2013年12月まで期間では事例発生数は2012/13 シーズンと比べて少ないが、今後も流行状況を監視していく必要がある(入谷研究協力報告)。

東京都において、2011年以降に検出されたサポウイルス GI.2 の7株は、VP1 のアミノ酸配列が2008年以降の株に近縁で、新たに1ヶ所の変異が認められた。過去の株と合わせて解析したところ、ノロウイルスと同様に継続的なアミノ酸変異を繰り返していることが確認できた。サポウイルスの集団事例では、調理従事者の関

与が推定される事例、カキの喫食歴のある事例、施設内の感染症的な事例が含まれ、サポウイルスの不顕性感染者糞便中のウイルス量が発症者群と有意差がみられなかった。これらのことから、サポウイルスはノロウイルスと同様に食中毒の原因として重要であり、検査体制の強化等が必要である(森研究協力報告)。

愛知県の2012/13 シーズン調査で、少なくとも5種類の GII.4 変異株が流行していたことが明らかとなった。2006b 変異株は2006/07 シーズンの大流行以来、感受性者の減少に伴い、流行規模は次第に縮小したが、2012/13 シーズンに2012 変異株が出現するまでは、優勢な変異株であった。GII.4 はヒトでの感染を繰り返す中で多様な変異株が出現しているが、その中から感染性や増殖性に優れたウイルスが大規模流行を起こすと推察される(小林研究協力報告)。

愛媛県で調査期間中に発生した食中毒事例は、調理従事者に胃腸症状がみられた1事例を除き、すべて不顕性感染の調理従事者が原因と推定された。そのうち3事例は、糞便中に排泄されるウイルス量が、患者と不顕性感染の調理従事者で大差はなかった。これらのことから、食中毒等集団発生の予防には、調理従事者への更なる衛生指導の徹底と日常の手洗いの指導が重要である(山下研究協力報告)。

熊本県で発生した集団感染事例において、不特定多数の人が出入りする施設の2階と3階で発生した集団事例由来株は Cap 領域及び Po1 領域のシーケンス解析で100%一致したが、同時期に検出された疫学的に無関係な散発事例由来株の中に

も 100%一致する株が複数存在した。このことから、集団事例の分子疫学解析を精度高く行うためには、シーケンス領域を広げる必要があると思われた(原田研究分担報告)。

3. 食品のウイルス検査の精度管理体制の確立

糞便材料を対象としたノロウイルス GII のリアルタイム PCR の定量検査の外部精度管理の結果、各検査機関で使用している検量線作成用 cDNA 溶液の違いが結果に大きく影響していることが示唆された。今後、検量線作成に使用する cDNA 溶液についても規定する必要がある。

外部精度管理の評価方法として、Xbar-R 管理図を使用して解析を行った結果、対数変換値を用いた場合、機関内のばらつきは通常の R 管理図における管理限界線を採用することで問題ないと考えられた。一方、Xbar 管理図では並列でデータを観察した際に大きく外れたデータの出現頻度もそれほど高くないことから、対数変換値での z-スコア=2 または 3 の値を管理限界線と設定して、この範囲を超えた場合に異常値とみなすことが妥当であるように思われた。しかし、今回の調査試料中の濃度が比較的高いことが各機関のデータのばらつきを小さくした可能性もあるので、Xbar 管理図の管理限界線については低濃度でのデータ分布を加味したうえで設定する必要があると思われる(鈴木研究分担報告)。

E. 結論

1. 食品からのウイルス検出法の開発・

標準化食品からのウイルス検出法および遺伝子解析法の開発

パンソルビン・トラップ法で得た検体の逆転写反応や PCR に使用する酵素や反応条件の最適化や DNase 処理やアミラーゼ処理の改善により、結果のばらつきとなる要因の減弱化と高感度化など検査精度の向上が図れた。

通知法の陽性判定基準(実測値 10 以上)に基づくリアルタイム PCR による検査では、偽陰性となる場合が多く、カキの安全性を確保することが困難であることが示された。

網羅的ゲノム解析法のウイルス性食中毒調査等への適応法を確立するために、臨床材料を用いて基礎的な研究を実施した。PCR 産物を解析対象とした場合、効率的に多様なノロウイルス遺伝子を検出し、解析可能であったが、検体から直接得た RNA を用いた場合は、ノロウイルス以外の遺伝子が多く含まれ、解析が困難であった。検査法の更なる検討が必要である。

2. 変異株等早期検出のための食品・環境等のサーベイランス

(1) カキにおける食品媒介ウイルスの汚染実態調査

2013 年 2 月採取カキ検体を中心として、カキの食品媒介ウイルスの汚染調査を実施した。加熱調理用カキは生食用カキと比較して、検出率、汚染ウイルス量、汚染ウイルスの遺伝子型数等が高い傾向にあった。生食用カキの汚染率は採取海域により大きく異なった。2012/13 シーズンに流行した GII/4 2012 変異株が多く検出され流行シーズンにおけるカキへの蓄積

が確認された。それ以外に、ヒトからの検出が稀な型、ブタ型のノロウイルスを含め多様な遺伝子型が含まれた。サポウイルスは GI.2 が多く検出された。A 型肝炎ウイルスおよび E 型肝炎ウイルスは検出されず、それらの汚染リスクは低いと考えられた。

(2) 下水等の食品媒介ウイルスの汚染実態調査

ヒトでの流行ウイルスやそれらの環境中での挙動を把握し、食中毒予防対策に資するため、ヒト、下水、カキからノロウイルス等の検出を試みた。下水、カキ、ヒトから検出されるノロウイルス遺伝子型は大まかには一致するものの、ノロウイルス GI/4 が患者数と比較して下水から多く検出されるなど、異なる傾向を示すことも認められた。アストロウイルス、アイチウイルスなどは、臨床検体からの検出と比較して、下水検体からは高頻度に検出された。

(3) 食品媒介事例等の疫学的研究および胃腸炎ウイルスのサーベイランス

2012/13 シーズンにおけるノロウイルスの主な流行株は GII/4 2012 変異株であった。GII/4 2012 変異株は ORF1 が GII.4_2007a, ORF2 と 3 の GII.4 のキメラウイルスであった。各地で発生した食中毒事例、散發性および集団胃腸炎から検出されたノロウイルス等について遺伝子解析を行い、流行ウイルスの遺伝子型、キメラウイルスの同定等を行い、流行株の性状把握を行った。2012/13 シーズンは GII/4 2012 変異株が主流であったが、少

なくとも 2006b 等他の 4 変異株の流行が確認された。2013/14 シーズンは前シーズンに引き続き、GII/4 2012 変異株が主流であるが、その割合は減少し、他の遺伝子型の活動が活発化していた。サポウイルスもノロウイルス同様に調理従事者関連食中毒、カキ関連食中毒等に関与し、またウイルス構造蛋白質における変異を繰り返していることが確認された。

3. 食品のウイルス検査の精度管理体制の確立

糞便試料を用いたノロウイルス GII のリアルタイム PCR 検査の外部精度管理を 12 機関を対象に実施した。定量値のバラツきの要因として、各機関で使用している検量線作成用 cDNA 溶液の違いが影響を及ぼしている可能性が示唆された。得られた測定値の対数変換値を用いて Xbar-R 管理図を採用することにより、精度管理の評価ができるものと考えられた。

F. 健康危害情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. N Iritani, A Kaida, N Abe, H Kubo, J Sekiguchi, SP Yamamoto, K Goto, T Tanaka, M Noda: Detection and genetic characterization of human enteric viruses in oyster-associated gastroenteritis outbreaks during 2001-2012 in Osaka City, Japan, Journal of Medical Virology (in press)