

2. Yoshimasa Sasaki, Mika Haruna, Mariko Murakami, Mizuho Hayashida, Kazuo Ito, Mamoru Noda, and Yukiko Yamada (2013) Prevalence of *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, and Hepatitis E Virus in Swine Livers Collected at an Abattoir, Jpn. J. Infect. Dis., 161-164
  3. 原田誠也, 大迫英夫, 吉岡健太, 西村浩一, 清田正憲, 李 天成, 石井孝司, 田中智之, 野田 衛 (2014) イノシン, シカおよびブタの E 型肝炎ウイルス感染状況調査-熊本県, IASR, 35(1), 9-10
  4. 小林慎一, 山下照夫, 皆川洋子: サポウイルス食中毒, 臨床とウイルス, 41, 52-60, 2013
  5. 青木里美, 菅美樹, 山下育孝, 服部昌志, 大倉敏裕, 四宮博人: ノロウイルスによる食中毒-愛媛県. 病原微生物検出情報月報, 34(9)13-16, 2013
  6. 田中智之. ノロウイルス食中毒. 臨床とウイルス(2013), 41(1);44-51
  7. 入谷展弘, 改田厚, 阿部仁一郎, 山元誠司, 久保英幸, 平井有紀, 後藤薫, 長谷篤: 2012-2013 シーズンに大阪市で認められたノロウイルス流行, 大阪市立環境科学研究所報告調査・研究年報 平成 24 年度版 第 75 集, 18-22 (2013)
  8. 野田 衛 (2013) A 型肝炎, 臨床とウイルス, 41(1), 61-68
  9. 野田 衛 (2013) ノロウイルス食中毒, 感染症の話題, 乳酸菌ニュース, No. 479, 7-16
  10. 野田 衛 (2013) ノロウイルス食中毒・感染症からまもる-その知識と対策-, 日本食品衛生協会
  11. 野田 衛 (2013) ノロウイルス食中毒の現状と対策, 食品と開発, 48(1), 8-11
  12. 野田 衛, 上間 匡 (2013) 第 3 章・第 1 節 ウイルス, 微生物の簡易迅速検査法
  13. 野田 衛, 福田 伸治 (2013) 第 10 章・第 1 節 感染症 4. ウイルスの簡易迅速検査法, 微生物の簡易迅速検査法
- 2. 学会発表**
1. 稲崎倫子, 名古屋真弓, 成相絵里, 小和田和誠, 葛口剛, 酢谷奈津, 松原祐子, 田中保知, 楠原一, 赤地重宏, 小林慎一, 皆川洋子, 小平彩里, 柴田伸一郎: 平成 24 年度の東海北陸地区におけるウイルス性胃腸炎の発生状況について. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸市, 平成 25 年 11 月 11 日
  2. 原田誠也, 徳岡英亮, 清田直子, 片山和彦, 岡智一郎: 感染性胃腸炎患者由来ヒトサポウイルスの RdRp 領域及び VP1 領域の分子系統樹比較解析, 第 61 回日本ウイルス学会, 神戸市 (2013. 11. 10-12)
  3. 溝口嘉範, 磯田美穂子, 木田浩司, 濱野雅子, 藤井理津志, 岸本壽男, 安原広己, 上間 匡, 野田 衛 (2013) 感染性推定遺伝子検査法の下水中のノロウイルス検出への応用,

- 第 106 回日本食品衛生学会学術講演会, 宜野湾市, 11/22
4. 溝口嘉範, 木田浩司, 葛谷光隆, 磯田美穂子, 濱野雅子, 藤井理津志, 岸本壽男, 上間 匡, 野田 衛 (2013) エコーウイルス 9 型定量系によるノロウイルス通知法の評価, 第 34 回日本食品微生物学会学術総会, 江戸川区, 10/3
  5. 佐藤裕徳, 横山 勝, 本村和嗣, 中村浩美, 岡 智一郎, 片山和彦, 武田直和, 野田 衛, 田中智之, ノロウイルス GII.4\_2006b のカプシドと酵素に働くアミノ酸変化の制約, 第 61 回日本ウイルス学会学術総会 2013 年 11 月 10 日~12 日, 神戸市
  6. 佐藤裕徳, 本村和嗣, 横山 勝, 中村浩美, 岡 智一郎, 片山和彦, 武田直和, 野田 衛, 田中智之 (2013) ノロウイルス GII.4 2006b のカプシドと酵素に働くアミノ酸変化の制約, 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸市, 11/12
  7. 斎藤博之, 東方美保, 岡智一郎, 片山和彦, 田中智之, 野田衛 (2013) 食中毒事例における食品のノロウイルス検査にパンソルビン・トラップ法を用いる際の RNA 検出系の最適化, 第 106 回日本食品衛生学会学術講演会, 宜野湾市, 11/22
  8. 斎藤博之, 東方美保, 岡智一郎, 片山和彦, 田中智之, 野田 衛 (2013) パンソルビン・トラップ法によって得られたノロウイルス RNA の効率的な検出に関する検討, 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸市, 11/12
  9. 三元昌美, 上間 匡, 栗原慶隆, 野田 衛 (2013) 感染性推定遺伝子検査法を用いたノロウイルスの乾燥状態および液体中の生存性の推定, 第 106 回日本食品衛生学会学術講演会, 宜野湾市, 11/22
  10. 三好龍也, 家永信彦, 柏井健作, 吉田永祥, 岡山文香, 芝田有理, 内野清子, 田中智之, 市販のノロウイルス抗原検出 IC キットの比較検討, 第 61 回日本ウイルス学会学術総会 2013 年 11 月 10 日~12 日, 神戸市
  11. 山下育孝, 青木里美, 菅 美樹, 服部昌志, 大倉敏裕, 野田 衛, 岡 智一郎, 四宮博人 (2013) 愛媛県におけるサポウイルス GI.2 株の流行, 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸市, 11/12
  12. 山元誠司, 入谷展弘, 改田 厚, 久保英幸, 長谷 篤: 感染性胃腸炎患者からのパレコウイルスの検出, 平成 25 年度地方衛生研究所全国協議会近畿支部ウイルス部会総会, 大津 (2013.9.20)
  13. 山元誠司, 入谷展弘, 改田 厚, 久保英幸: 2013 年 4~5 月に大阪市内で流行したロタウイルス (G1-P[8]-I2) の遺伝子解析, 第 61 回日本ウイルス学会, 神戸 (2013.11.10-12)
  14. 重本直樹, 谷澤由枝, 島津幸恵, 高尾信一, 田中智之, 野田 衛, 福田伸治, 蛍光 RT-マルチプレックス PCR 法による小児胃腸炎患者便からの下痢症ウイルスの検出, 第 61 回日本ウイルス学会学術総会 2013 年 11 月 10 日~12 日, 神戸市

15. 小林慎一, 中村範子, 安達啓一, 伊藤 雅, 安井善宏, 山下照夫, 皆川洋子, 平成 24 年度の愛知県におけるノロウイルスの検出状況 (12/13 シーズン), 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 2013 年 11 月 神戸市
16. 上間 匡, 三元昌美, 青沼えり, 野田 衛 (2013) ノロウイルスのリスク評価のための感染性推定遺伝子検査法の開発, 第 106 回日本食品衛生学会学術講演会, 宜野湾市, 11/22
17. 上間 匡, 三元昌美, 青沼えり, 栗原慶隆, 野田 衛 (2013) ノロウイルスの感染性推定遺伝子検査の開発と応用, 第 34 回日本食品微生物学会学術総会, 江戸川区, 10/3
18. 森功次, 宗村佳子, 林志直, 甲斐明美: 東京都において集団胃腸炎事例から検出された Sapovirus について. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 (神戸市), 2013
19. 青沼えり, 上間 昌, 野田 衛 (2013) ウイルスの食品検査の精度管理に関する基礎的研究, 第 34 回日本食品微生物学会学術総会, 江戸川区, 10/3
20. 青木里美, 山下育孝, 菅 美樹, 服部昌志, 大倉敏裕, 野田 衛, 四宮博人 (2013) 2012/2013 シーズンに検出されたノロウイルス GII.4 の分子疫学的解析, 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸市, 11/12
21. 田中智之, 左近直美, 三好龍也, 上林大起, 内野清子, 加瀬哲男, 大阪府における 2012/13 シーズンのノロウイルス集団感染の実情, 第 61 回日本ウイルス学会学術総会 2013 年 11 月 10 日~12 日, 神戸市
22. 東久保靖, 久常有里, 谷沢由枝, 重本直樹, 高尾信一, 田中智之, 野田衛, 福田伸治: 蛍光 RT-Multiplex PCR 法による食中毒等集団感染事例からの下痢症ウイルスの検出. 第 56 回広島県獣医学術学会, 2013 年 8 月, 広島市
23. 東久保靖, 久常有里, 谷沢由枝, 重本直樹, 高尾信一, 田中智之, 野田衛, 福田伸治: 蛍光 RT-Multiplex PCR 法による食中毒等集団感染事例からの下痢症ウイルスの検出. 平成 25 年度獣医学術中国地区学会, 2013 年 10 月, 鳥取市
24. 入谷展弘, 改田厚, 阿部仁一郎, 山元誠司, 久保英幸, 平井有紀, 後藤薫, 長谷篤: 2012-2013 シーズンに大阪市で認められたノロウイルス流行について, 第 25 回ウイルス性下痢症研究会学術集会, 神戸 (2013. 11. 9)
25. 入谷展弘, 山元誠司, 改田厚, 岡智一郎, 久保英幸: 2012/13 シーズンに大阪市で多発したサポウイルス集団胃腸炎事例, 第 61 回日本ウイルス学会, 神戸 (2013. 11. 10-12)
26. 本村 和嗣, 大出 裕高, 横山 勝, 中村浩美, 佐藤 彩, 岡 智一路, 片山 和彦, 野田 衛, 武田直和, 田中 智之, 佐藤 裕徳 (2013) ノロウイルス感染者体内における混合感染の実態, 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸市, 11/12

27. 名古屋真弓, 稲崎倫子, 板持雅恵,  
嶋 一世, 堀元栄詞, 小渕正次, 野  
田 衛, 佐多徹太郎, 瀧澤剛則  
(2013)患者・下水・岩ガキからのノ  
ロウイルス・サポウイルスの検出,  
第 61 回日本ウイルス学会学術集会,  
神戸市, 11/11
28. 野田 衛 (2013)2012/13 シーズンの  
ノロウイルス食中毒発生状況, ウイ  
ルス性下痢症研究会第 25 回学術集会,  
神戸市, 11/9

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 研究分担報告書

田中 智之  
斎藤 博之  
名古屋 真弓  
上間 匡  
鈴木 達也  
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(食品の安心・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」

研究協力者 総括報告

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
	佐藤 直人	岩手県環境保健研究センター
	植木 洋	宮城県保健環境センター
	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
	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
	三好 龍也	堺市衛生研究所
	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
	本村 和嗣	大阪大学微生物病研究所

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5分野に大別された。

1. 集団、散発を問わず、急性胃腸炎事例数の中でウイルスが関与する事例は多く、中でもノロウイルスの関与頻度は、約50%~87%に達している。ノロウイルス関与の中では有意にG. II/4 Sydney\_2012 遺伝子型が多かった。
2. ノロウイルス以外の急性胃腸炎ウイルスには、エンテロウイルス、サポウイルス、ロタウイルス、アデノウイルス、アストロウイルス、アイチウイルス、ヒトボカウイルスの関与が報告された。頻度的にはサポウイルスが10%前後と高い。
3. 市販或いは養殖場から得られたカキに蓄積された食中毒関連ウイルス遺伝子の検出結果、多くの遺伝子型をもつノロウイルスが高頻度に検出された。とくに、今回の報告ではキメラノロウイルス; GII/4

Sydney2012 がカキ及び臨床検体の大部分から検出され、遺伝子的に高い相同性がみられた。

4. 下水処理に關与する環境水中から通年性にノロウイルス遺伝子が検出されたが晩秋から初春に多く、夏季に減少する傾向を示した。多くの遺伝子型が検出されたが GII/4 Sydney2012 株が最も高頻度に検出された。感染症発生動向調査での感染性胃腸炎としての報告数は少ないが、サポウイルス、アストロウイルス、アイチウイルスも高頻度に検出された。流入水、放流水中における遺伝子コピー数の比較では、流入水に比べ  $10\sim 10^2$  コピーの減少であった。
5. Norovirus Surveillance Group of Japan の協力で得られた糞便検体の解析結果、Sydney\_2012 は、国内で流行した主要な株であった。ゲノム構造解析では、Sydney 2012 は GII. 4 亜株間のキメラウイルスで、ORF1 が GII. 4\_2007a であり、ORF2 と 3 は GII. 4 であった。抗原エピソード A-E の領域には、2006b と比較して、Sydney\_2012 には、6 箇所の特徴的変異が見つかった。

#### A. 研究目的

本研究班の目的は食中毒の原因究明、とりわけウイルスを介した食中毒事例についてウイルス学的に解析・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。

食中毒事例の最前線に立ち原因究明に取り組み且つ感染防止について提言している行政機関が地方衛生研究所(地衛研)である。この班では全国 79 地衛研の中、北海道から九州に至る 14 地衛研の研究協力者から構成されている。

ウイルス性食中毒の主な原因ウイルスであるノロウイルスの感染経路は様々であるが、とりわけ食を介する経口感染による急性胃腸炎発症の頻度が高い。食品を汚染させない、汚染の可能性の高い食材は十分な加熱処理をして喫食する。最も基本的な食中毒予防対策の遵守は重要である。

下記に述べる研究成果は各研究協

力者所在の自治体で発生した食中毒事例について、ノロウイルスが原因となる頻度、またそのウイルス遺伝子型の特徴について検出・解析した。加えて、ノロウイルス以外のウイルスの食中への關与について解析した。

また、汚染食材として頻度の高いカキを対象に、総括的に下水放流水中のノロウイルス遺伝子の検出を含めて、カキ中のウイルスの保有状況について、各地域のカキのウイルス検出状況を調査した。

今年度の全国地衛研 14 研究協力者の調査研究内容は、次のカテゴリーに大別できる。

- (1): 食中毒事例におけるノロウイルスの關与の程度、遺伝子学的特徴。
- (2): 食中毒事例における他の病原ウイルスの關与の程度。
- (3): カキ中ノロウイルス遺伝子含有の頻度と遺伝子型。
- (4): 下水処理施設における流入水・

放流水、河川水等でのノロウイルス環境汚染とノロウイルス胃腸炎の流行(感染)の関連性。

(5): ノロウイルス流行の要因であるウイルス遺伝子の変異実態。

これらの5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を中心とした臨床材料、事例に関係する食材等を用いた。環境材料では下水に関連する環境水等を用いた。

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、相同性を比較した(国立感染症研究所下痢症ウイルス検出マニュアル)。

環境中のノロウイルス遺伝子検索には、メンブランフィルター法にて検体を濃縮する方法、垂下カキ、岩ガキ等は食品中の病原ウイルスの検出法に関する研究; 二枚貝(カキ)からのウイルスの濃縮法に準じた。(この項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。

## C. 研究結果

(1): 食中毒事例におけるノロウイルス

関与の程度。

集団胃腸炎事例数の中でノロウイルスの関与頻度は、48%(森)、61%(山下)、73%(原田)、87%(小林)となっている。また、散発発生例においても、55%(山下)、56%(原田)、39%(小林)であった。ノロウイルス関与の中では有意にG. II/4Sydney 2012 遺伝子型が多かった。食中毒事例と明記した9事例全てからGII. 4Sydney2012が検出されている(山下)。

(2): 食中毒事例における他の病原ウイルスの関与。

頻度的にはサポウイルスが10%前後と高いが、ノロウイルス以外のウイルス関与が報告されている。サポウイルス、ロタウイルス、ノロウイルスとアデノウイルス(森)、サポウイルス、ロタウイルス、アデノウイルス(山下)、エンテロウイルス、サポウイルス、アデノウイルス、ロタウイルス、ボカウイルス、アストロウイルス、アイチウイルス(原田)がある。

(3): カキに含まれるノロウイルスの程度と遺伝子型。

市販或いは養殖場から得られたカキに蓄積された食中毒関連ウイルス遺伝子の検出は多くの研究協力者によって行われた。解析され遺伝子と実際の食中毒事例臨床検体から検出された遺伝子型との比較検討がなされている(入谷、重本、田村、吉澄、吉富、山本、三上、佐藤、植木)。カキ中腸腺に蓄積されたノロウイルスから多くの遺伝子型が検出される事は、過去の本研究班でも確認されている。これ



まで、臨床検体とのウイルス遺伝子型の相同性から食中毒原因の特定を試みたが困難な場合が多数見られた。

しかし、今回の報告では GII/4 Sydney2012 という特徴的なキメラノロウイルスがカキ及び臨床検体の大部分から検出され、遺伝子的に高い相同性がみられた。「卵が先か鶏が先か」、直接的な証明には十分な疫学的調査が求められるが、ノロウイルス食中毒の因果関係をより強く示す事が明らかになって来た。

(4): 水処理施設における流入水・放流水、河川水等へのノロウイルス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。

検出方法は、下水等の検体を陰電荷フィルターでろ過・吸着させ濃縮後に遺伝子を検出する方法をとっている(三好、佐藤)。

通年性にノロウイルス遺伝子が検出されたが晩秋から初春に多く、夏季に減少する傾向を示した。遺伝子量はノロウイルス流行との関連性がみられた。多くの遺伝子型が検出されたが GII/4 が最も抗頻度に検出された(三好)。サポウイルス、アストロウイルス、アイチウイルスが高頻度に検出されたが、実際の感染症発生動向調査での感染性胃腸炎報告数は少なく、不顕性感染、或いは軽症の感染がかなり多く発生している可能性が示唆された(三好)。一方、流入水、放流水中における遺伝子コピー数の比較では、流入水に比べ  $10 \sim 10^2$  コピーの減少であった。下水処理場ではある

程度のウイルスは除去されるが、放流水中にはなお存在し、それらがカキに蓄積されると推測し、GII/4 Sydney2012 株の環境循環によって確認されている(佐藤)。

(5): ノロウイルス流行の要因であるウイルス遺伝子の変異実態。

Norovirus Surveillance Group of Japan の協力で得られた糞便検体の解析結果、Sydney\_2012 は、国内で流行した主要な株であることがわかった。ゲノム構造解析の結果、Sydney 2012 は GII.4 亜株間のキメラウイルスで、ORF1 が GII.4\_2007a であり、ORF2 と 3 は GII.4 であった。抗原エピトープ A-E の領域には、2006b と比較して、Sydney\_2012 には、6 箇所の特徴的変異が見つかった。Sydney\_2012 は、抗原性を大きく変え、集団免疫より逃避できた可能性が高いことが示唆され、このことが大流行原因の主流株となり得たことが示唆された。

#### D. 今後の課題

1. 集団食中毒事例では、ノロウイルスの関与が常に高頻度である。

この研究班のこれまでの調査実績をより詳細に解析し、ノロウイルス感染予防に向けた提言を、保健所を含めた行政機関により強く提言を行うべき時期にある。

2. この班の前報のように、食中毒事例の検体から複数のウイルス遺伝子が検出されている。

感染性ウイルスの優劣、病原性への影響等混合感染の意義解析する必

要がある。この解析は、これだけ多くの事例を共有している地方衛生研究所のみしか出来ない研究と考える。

3. カキからノロウイルス遺伝子の検出は、環境水中からの遺伝子検出と同様に、既に地域流行の後のカキ中腸腺への蓄積産物である。不顕性感染等の流行実態が十分把握できていない事例の疫学研究・還元には有用な手段である。また、次期流行シーズンの予測的な意義も有している。さらに、カキ生食による食中毒防止啓発活動の大きな原動力となる。今後の継毒調査研究は必要だが、活用効果の効率性が求められると考える。
4. 環境中水における食中毒原因ウイ

ルスを検出し、感染症発生状況をモニタリングすることは意義あることと考える。しかし、解析結果の還元にはタイムラグは避けられず、レトロスペクティブな成果としてのみ還元されている。

しかし、今年の流行主流株であった GII/4Sydney2012 は、既に3～5月に数例検出されている。環境検体解析から感染症予測情報を発信出来るシステム構築が可能か、今後の課題と考える。

5. 通年的に Norovirus Surveillance Group of Japan から収集された臨床検体から、次年度に流行するであろう主流株の予測システムへの構築が大きな課題と考える。

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出法に関する研究」

研究分担報告書

## 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

研究分担者 齋藤博之 秋田県健康環境センター・保健衛生部  
研究協力者 秋野和華子 秋田県健康環境センター・保健衛生部

### 研究要旨

パンソルビン・トラップ法は、食品検体に含まれるウイルス粒子を黄色ブドウ球菌の表面に吸着させて回収することを基本原理としている。その性質上、抽出された RNA には大量の黄色ブドウ球菌由来の遺伝子が混入することになるが、極微量のウイルス RNA を安定的に保持するキャリアーとして働くため、検出感度に対してはプラスの効果が見込める。その一方で、大量の黄色ブドウ球菌の遺伝子の中に含まれるウイルス遺伝子を検出するという特異な条件を課されることから、試験機関によって検出精度がバラつくという問題が指摘された。そこで、検出結果に差を生じやすい箇所について反応条件等を最適化する必要があった。 $\alpha$ -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ておくことで対応した。液化調製品は $-20^{\circ}\text{C}$ で 2 ヶ月以上安定保存でき、粉末を直接投入した場合と同等の効果があることを確認した。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 通りを実施できるようにした。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、 $58^{\circ}\text{C}$ 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。

### A. 研究目的

ウイルス性食中毒の対策として二枚貝の汚染実態調査や、調理従事者への衛生教育等が進められてきている。しかしながら、原因として疑われる食品からのウイルス検出は、その作業の困難さからこれまでほとんど検討されてこなかったため、具体的な汚染ルート

の解明に決め手を欠いていた。原因物質としてはノロウイルス(NoV)が大部分を占めているが、他にもサポウイルス(SaV)やアデノウイルス41型(AdV41)に代表される腸管系アデノウイルスも含まれている。さらに、輸入食品等が原因と考えられる A 型肝炎ウイルス(HAV)感染者の報告が急増するなど、食

品中のウイルスを検出する方法の確立が急務となっている。平成 19~21 年度に実施された厚生労働科学研究費補助金「食品中のウイルスの制御に関する研究」(H19-食品-一般-016)において、固形、液状、練り物、油物などの一般的な食品から NoV を検出する手法としてパンソルビン・トラップ法(パントラ法)を開発し、この問題を解決するための糸口を見出すことができた。その後、平成 22~24 年度に実施された厚生労働科学研究費補助金「食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究」(H22-食品-一般-013)において、市販のガンマグロブリン製剤を利用することで添加抗体の安定供給が図られた他、検出した遺伝子の塩基配列解析も可能な方法として発展させることができた。一方、平成 24 年度に実施した共通試薬と共通検体を用いたコラボ・スタディにおいて、試験機関ごとの結果のバラつきが問題となった。そこで今年度は、結果に差が生じやすい箇所に注目し、反応系等を最適化することによって検出精度を向上させるための検討を行った。

## B. 研究方法

### 1. 研究材料

実験に用いる食品として、市販されているきな粉とポテトサラダを用いた。また、検出対象となるウイルスとして、NoV-GII/4 (AB293424)を含む糞便を用いた。

### 2. 試薬類

#### 1) 食品洗滌液

Tris-HCl (pH8.4) – 0.5M NaCl – 0.1% Tween20 を調製して使用した。

#### 2) 5%ガンマグロブリン製剤

米国 Baxter 社の 5% 静注用ガンマグロブリン製剤「Gammagard」を用いた。Alfresa Pharma 社から購入した。

#### 3) パンソルビン

黄色ブドウ球菌を熱処理してホルマリン固定したものの懸濁液で、メルク社から購入した。

#### 4) フェノール系 RNA 抽出キット

TRIzol-LS (invitrogen)を使用した。

#### 5) カラム方式の RNA 抽出キット

QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen)を使用した。

#### 6) 再懸濁液

5)の抽出キット添付の AVL 液を用いた。

#### 7) DNase I (RT Grade) 及び RNase inhibitor

ニッポンジーンの製品を使用した。

#### 8) Heal-labile double strand specific DNase (HL-dsDNase: 易熱性 2 本鎖特異的 DNase)

ノルウェーArcticZymes 社から購入した。

#### 9) アミラーゼ

枯草菌由来  $\alpha$ -Amylase 粉末(和光純薬)を使用した。

#### 10) 食品処理袋

サニスペックテストバッグ(アズワン)を使用した。

#### 11) 逆転写酵素

表 2 に記載したものをを使用した。

#### 12) conventional PCR 用酵素

表 1 に記載したものをを使用した。

#### 13) 抗 Taq モノクローナル抗体

anti-Taq high (東洋紡)を使用した。

#### 14) 逆転写反応に用いたプライマー

逆転写反応専用プライマー PANR-G2 (平成 24 年度報告書:H22-食品-一般

-013)を用いた。

15) conventional PCR に用いたプライマー  
COG2F / G2SKR、または G2SKF /  
G2SKR のプライマーセットを用いた。

16) conventional PCR 装置  
アステック社製「PC-320」を用いた。

17) real-time PCR 装置  
ロシュ社製「LightCycler 320S」を用い  
た。

18) real-time PCR 用酵素  
ロシュ社製「LightCycler FastStart  
DNA Master PLUS Hybridization  
Probes」を用いた。

19) real-time PCR 反応系  
Kageyama らの方法 (J. Clin.  
Microbiol., 41, 1548-1557, 2003) に従  
った。

### 3. 結果の差が生じやすい箇所の想定

試験機関によって結果のバラつきが生じ  
やすい部分として、次の 4 箇所を想定した。  
この内、(1)はウイルス RNA 抽出段階(狭義  
のパントラ法)のものであり、(2)~ (4)は抽出  
した RNA の検出段階に相当する。

(1)  $\alpha$ -Amylase 粉末の不溶性成分の残留  
に関する問題

(2)抽出した RNA 溶液に対する DNase 処  
理の問題

(3)逆転写酵素の選定と反応条件最適化

(4)PCR 酵素の選定と反応条件最適化

なお、プロトコル上の順番は(1)→(4)である  
が、最適化にあたっては逐次結果を観察し  
ながら行う必要があるため、検討の順番は  
(4)→(1)とした。すなわち、最初に(4)の検討  
と最適化を行い、次に(3)を検討する(最適  
化済みの(4)を用いて結果を観察する)という

順になる。

### 4. パントラ法の手順

平成 22 年度に完成した汎用プロトコル  
(図 1)に従った。本研究では、各種酵素の  
選択と反応条件の最適化のために、「パント  
ラ抽出物」による負荷試験を行った。「パント  
ラ抽出物」は、ウイルスを含まない市販のき  
な粉からパントラ法のプロトコルを用いて調  
製した。

### 5. PCR に関する検討

NoV 検査のために国立感染症研究所より  
配布されている定量コントロール DNA を蒸  
留水、及びパントラ抽出物で段階希釈するこ  
とで、 $10^5 \sim 10^1$  コピー/ $\mu$ L の NoV 遺伝子配  
列由来 DNA 断片を含む被検体を調製した。  
これらを、表 1 に示した 32 種類の PCR 反  
応系で増幅効率を比較した。プライマーセッ  
トは G2SKF / G2SKR を用い、反応容量 25  
 $\mu$ L 中に上記被検体が 5  $\mu$ L 含まれるよう  
にした。表 1 では、酵素の種別としてファミリ  
ー A (pol 型酵素)、ファミリー B ( $\alpha$  型酵素)、及  
びそれらの混合 (Blend) を示した。また、ホ  
ットスタート仕様の有無 ("H"、及び "-") と  
Mg の終濃度 (mM) も記載した。例えば、  
「A/ H / 1.5mM」の表記は「ファミリー A に属  
する酵素が用いられ、ホットスタート仕様で、  
Mg 濃度は 1.5mM で反応を行う」という意味  
になる。また、将来的に偽陽性対策を講ずる  
布石として、基質に dUTP を用いた反応系  
も同時に比較した。PCR 装置の温度プログ  
ラムは、次に示すとおりタッチダウン PCR  
を基本としたが、denature 温度と時間、及  
び extension 温度と時間は酵素の添付説明  
書に従って設定した。反応 buffer は酵素添

付のものを基本とし、さらに  $MgCl_2$  を追加して  $Mg^{2+}$  を増加させたものも検討した。

#### 【タッチダウン PCR】

95°C 2 分 1 サイクル

95°C 30 秒 - (55→50°C) 30 秒 - 72°C 30 秒  
5 サイクル: 下線部がタッチダウン設定

95°C 30 秒 - 50°C 30 秒 - 72°C 30 秒 40 サイクル

72°C 7 分 1 サイクル

### 6. 逆転写反応に関する検討

糞便検体より抽出した NoV の RNA を蒸留水、及びパントラ抽出物で段階希釈した被検体を調製した。DNase 処理は行わずに、逆転写反応専用プライマー PANR-G2 と表 2 に示す逆転写酵素を用いて cDNA を合成した。反応温度は、添付説明書に記載があるとおり 37°C、42°C、55°C、58°C、及び 60°C にて行った。反応容量は 20  $\mu$ L で、上記被検体が 10  $\mu$ L 含まれるようにした。30 分の逆転写反応後、蒸留水を 20  $\mu$ L 加えたもの (2 倍希釈) を 5  $\mu$ L 取り、real-time PCR と先に最適化を済ませた conventional PCR (プライマーセットは COG2F / G2SKR) の反応系により増幅効率を比較した。conventional PCR で増幅バンドが観察された場合は切り出して塩基配列を確認した。

### 7. DNase 処理に関する検討

糞便検体より抽出した NoV の RNA 溶液に対して、DNase I 処理 (37°C 10 分) を行い、75°C 5 分加熱する反応系を基本 (一般的に行われている方法) とした。さらに、加熱をしない反応系として、DNase I と易熱性酵

素である HL-dsDNase を用いた場合を比較した。また、パントラ法で RNA 抽出を行う途中で DNase I を作用させる「オンカラム DNase I 処理」についても検討した (図 7)。これらの方法で DNase 処理を行った後、先に最適化を済ませた逆転写反応系により cDNA を合成し、real-time PCR でコピー数を測定した。

### 8. $\alpha$ -Amylase 処理に関する検討

図 10 に示したとおりの手順で  $\alpha$ -Amylase 粉末を液化調製した。-20°C にて 2 ヶ月保存した後、効果の確認を行った。炭水化物除去効果確認のために、0.1% 馬鈴薯デンプン液 (蒸留水にて加温糊化) とポテトサラダ 10g を 50mL の蒸留水に懸濁して食品処理袋のフィルターを通した濾液を用いた。これらの被検体 50mL に  $\alpha$ -Amylase 粉末 0.125g、または液化調製品 1mL を添加して、37°C 15 分静置し、3,000rpm 30 分遠心した上清を 5mL 分取し、そこに日本薬局方「ヨードチンキ」50  $\mu$ L を加えてヨウ素デンプン反応を観察した。

次にパントラ法を実施する上での影響を検討するために、食品洗滌液に NoV を添加したもの (食品は入れない) に対して、次の操作を行い、RNA 抽出液を得た。

- (1) 図 1 のチェックポイント①で  $\alpha$ -Amylase 粉末 0.125g を加え、チェックポイント②において、スポイトを用いて上清を別チューブに丁寧に分取したもの
- (2) 図 1 のチェックポイント①で  $\alpha$ -Amylase 粉末 0.125g を加え、チェックポイント②において、上清をデカントにより別チューブに移したもの
- (3) 図 1 のチェックポイント①で  $\alpha$ -Amylase

粉末 0.125g を加え、その後の遠心を行わなかったもの

- (4) 図 1 のチェックポイント①で  $\alpha$ -Amyalse 液化調製品 1mL を加え、チェックポイント②において、上清をデカントにより別チューブに移したもの

抽出した RNA を鋳型として先に最適化を済ませた逆転写反応系で cDNA を合成し、real-time PCR で検出を試みた。

## C. 研究結果

### 1. PCR に用いる酵素の選定と反応条件最適化

NoV 遺伝子配列由来 DNA を蒸留水で段階希釈した被検体を鋳型とし、通常のデオキシヌクレオチド(dATP、dGTP、dCTP、dTTP)を基質として PCR を行った場合には酵素製品間の差はほとんど認められなかった。一方、dTTP を dUTP に置換した場合には、ファミリー A に属する酵素製品のみが有効で、ファミリー B に属する酵素製品、及びファミリー A とファミリー B の混合製品では増幅が起こらなかった(図 2A に一部を示す)。例外として、表 1 の No.9 はファミリー B に属するが、dUTP を取り込めるように酵素蛋白が改変されている。また、表 1 の No.20 はファミリー A であることから、理論的に dUTP を用いることが可能だが、製品構成として buffer とデオキシヌクレオチドがプレミックスされていることから dUTP に置換することができなかった。

一方で、NoV 遺伝子配列由来 DNA をパントラ抽出物で段階希釈した被検体を鋳型とした場合には酵素製品間で大きな差が生じた。例えば、図 2A(蒸留水による希釈)上段左の酵素製品(表 1 の No.21)では良好な

遺伝子増幅が得られたが、図 2B 上段左(パントラ抽出物による希釈)では感度が著しく低下していた。同じ酵素製品に抗 Taq モノクローナル抗体を加えて”ホットスタート化”すると、図 2B 中段左に示すとおり蒸留水で希釈した場合と同等に感度が回復した。一方、基質の中の dTTP を dUTP に置換した反応系では感度がやや低いものの、Mg 濃度を 4.5mM まで増量することである程度の改善が見られた。そこで、ホットスタート仕様であることと、Mg を増量することに着眼し、基質として dUTP を用いてもなお図 2A の上段右と同等の感度が得られる反応系を検討したところ、図 2C に示す 3 つ(表 1 の No.12、No.27、No.32)が選択された。この内、No.12(図 2C 下段)については最初から dUTP が組み込まれたプレミックス製品であり、基質を入れ替える必要がないことから第一選択とした。この酵素製品は、55°C を境に酵素活性が ON/OFF される仕組み(アプタマー)が導入されていて反応特異性の向上に寄与しているが、PCR の第一サイクルだけは、より高温のホットスタートが望ましいため抗 Taq モノクローナル抗体を添加することで補完した。

### 2. 逆転写酵素の選定と反応条件最適化

NoV RNA を蒸留水で段階希釈した被検体を鋳型とした場合には表 2 に示した酵素製品間の差はほとんど認められなかった。しかし、パントラ抽出物で段階希釈した被検体では製品間で差が生じ、RNA が低濃度になるにつれその差は顕著となった。図 3A には  $10^5$  コピー/ $\mu$ L の RNA を被検体とした場合の増幅曲線を示したが、37°C で反応を行う逆転写酵素(表 2 の No.1)では明らかに増

幅効率が落ちていた。 $10^3$  コピー/ $\mu$ L (図 3B)、 $10^2$  コピー/ $\mu$ L (図 3C)と濃度が低い被検体になると 42°Cで反応を行う逆転写酵素(表 2 の No.2、No.5)においても増幅効率の低下が観察された。図 3A~図 3C の増幅曲線では、横軸からの立ち上がりサイクルを見る限り製品間の差はほとんどなく、被検体に含まれる RNA のコピー数もほぼ同じに算定されたが、縦軸(増幅効率)において差を生じており、検出限界に影響が及んでいた(37°Cで反応を行う酵素では図 3B と図 3C においては、もはや増幅が見られない)。

以上のことから、逆転写反応においては反応温度が重要であることがわかったため、温度をさらに上昇させた場合について検討した。高温反応に対応した逆転写酵素(表 2 の No.4)を用いて、55°Cと 60°Cで反応させた場合、後者の増幅効率がより高かった(図 4A)。次に反応温度を 58°Cと 60°Cで比較したところ、低濃度の被検体になるほど前者の増幅効率が高かった(図 4B)。反応温度が 58°Cで最適化されたことから、高温反応に対応した逆転写酵素間での比較検討を行った(表 2 の No.4 と No.6)。図 5A と図 5B のとおり、両者の比較では表 2 の No.4 に示した逆転写酵素の増幅効率が高かった。比較対照として、42°Cで反応を行う逆転写酵素(表 2 の No.3)も同時に用いたが、前述のとおり 58°Cの高温逆転写酵素よりも増幅効率は低かった。

次に図 3~5 において real-time PCR で検討した被検体を、先に最適化を済ませた conventional PCR で増幅して、非特異反応の有無を確認した(図 6)。37°Cで反応を行う酵素ではバンドが観察されず(図 6 左)、42°Cで反応を行う酵素では低濃度の被検

体になると黄色ブドウ球菌のバンド(16s リボソーム)が出現した(図 6 中列)。高温逆転写酵素を用いた場合(図 6 右列)、55°Cの反応では黄色ブドウ球菌のバンドが若干認められたものの、58°Cでは NoV のバンドのみが観察された。

### 3. 抽出した RNA 溶液に対する DNase 処理法の検討

高温逆転写反応によって、黄色ブドウ球菌由来の遺伝子等に起因する非特異反応を抑制することが可能となったが、陰性検体を semi-nested PCR で再増幅した場合に、NoV とは無関係のバンドが出現することがあった。こうした非特異バンドは、real-time PCR(ハイブリ試験に相当)では反応しないことから誤判定には至らないものの、増幅サイズによっては一時的な混乱をきたすおそれがあるため、逆転写反応の前に DNase 処理を行うことが推奨されている。一方で、一般に広く用いられている DNase I を用いたプロトコルでは、反応後に不要となった DNase I を失活させるために 75°C 5 分の加熱処理が必要であり、そのことがウイルス RNA の分解をもたらすというジレンマが指摘されている。加熱による RNA 分解は、リボースの OH 基の求核置換反応に由来するものであり、純粋に化学的であることから RNase inhibitor の添加では防ぐことができない。従って、解決策として加熱を行わない方法を考案する必要がある。方法の 1 つとして、北極海に生息するエビ由来の易熱性 DNase (HL-dsDNase) の有用性に着目した。この酵素は 37°Cで 2 本鎖 DNA を特異的に分解し、50°Cで活性を示さなくなり、55°Cで不可逆的に失活する性質を有してい



る。従って、先に最適化を済ませた 58°C の高温逆転写反応を組み合わせるならば、DNase 処理後に 75°C の加熱を行う必要はなくなる。なお、この酵素はまだ我が国では流通していないため、ノルウェーの ArcticZymes 社から直接取り寄せる必要がある。そこで、一般的に流通している DNase I を用いた上で、加熱を行わない方法として オンカラム処理を考案した。別メーカーの RNA 抽出キットの中には、オンカラム DNase I 処理工程が組込まれているものもあるが、「QIAamp Viral RNA Mini Kit」にはそのプロセスがないため、改めて組込んだプロトコルを図 7 に示した。

NoV RNA を含んだ蒸留水、またはパントラ抽出物に対して上記の DNase 処理を行い、先に最適化を済ませた高温逆転写反応(表 2 の No.4)によって cDNA を合成した後、real-time PCR でコピー数を測定した結果を図 8A と図 8B に示した。DNase 処理を行わなかった場合と比較して、75°C 5 分の加熱を伴う DNase I 処理ではコピー数が 1/5 ~ 1/10 に減少した。単純に加熱を省いた場合でも減少が見られた。一方、HL-dsDNase 処理とオンカラム DNase I 処理ではいずれもコピー数の減少は認められなかった。

#### 4. $\alpha$ -Amylase 粉末の不溶性成分の残留に関する検討

食品中に多く含まれる炭水化物は物理化学的挙動が核酸(ポリリボース)と類似していることから、PCR の阻害物質とされている。カキの検査法においても、混入しているグリコーゲンを分解するために  $\alpha$ -Amylase 粉末が用いられている。パントラ法では、図 1

に示すとおり  $\alpha$ -Amylase 粉末を添加するプロセスがある。しかし、この粉末には不溶性成分が含まれており、図 9 に示したとおり遠心によって沈澱してくる。メーカーに問い合わせたところ、不溶性成分は錠剤などの製造に使う賦形剤ということであった。具体的な成分は非公開であったが、一般的にメチルセルロースや無水ケイ酸などが用いられることが多い。遠心後に上清を丁寧に別チューブに移し、不溶性成分を完全に除去するようにすれば問題は起こらないが、手間がかかることからデカントで済ませるケースも想定される。この場合、 $\alpha$ -Amylase の不溶性成分が以後の工程に残留することになり、最終的な検出精度に影響を及ぼすことがわかったため、その解決策を検討した。 $\alpha$ -Amylase をグリセロール溶液とした液体酵素製品もあるが、20  $\mu$ L 程度の反応系を想定しているため、50mL のパントラ法のプロトコルで用いるにはコスト面において現実的ではない。そこで、 $\alpha$ -Amylase 粉末を液化調製する方法を考案した(図 10)。この  $\alpha$ -Amylase 液化調製品を -20°C に 2 ヶ月保存した後、デンプンの分解効果を観察した。デンプン液(図 11A)とポテトサラダ(図 11B)のいずれにおいても、液化調製品を添加することによってヨウ素デンプン反応が消失した。

次にパントラ法のプロトコルにおいて、不溶性成分が残留した場合と、あらかじめ不溶性成分を取り除いた液化調製品を用いた場合とで検出結果への影響を比較した。図 12A の No.2 と No.3 は不溶性成分が残留しているが、TRIzol 抽出後の水層(図 1 のチェックポイント③)は無色透明であった。しかし、カラムにアプライする直前にエタノールを添加したところ(図 1 のチェックポイント④)、不

溶性成分に由来する白濁が生じた(図 12A)。一方、 $\alpha$ -Amylase 液化調製品を添加した場合にはこのような白濁は生じず、円滑に RNA 抽出工程を終えることができた。抽出した RNA を鋳型として、先に最適化を済ませた高温逆転写反応により cDNA を合成し、real-time PCR で検出を試みた結果を図 12B に示した。不溶性成分が残留した状態では、図 12A で白濁を生じただけでなく、PCR も阻害された。不溶性成分をあらかじめ除去した液化調製品を用いることで、こうした不都合がなくなり、検出結果を正常化することができた。

## D. 考察

### 1. 結果のバラつきが起こりやすい箇所

本法はすでに複数の実事例において食品からの NoV の検出に成功していることから、プロトコルとしては完成の域にあるものと考えられる。しかし、実施する機関が増えるにつれて、検出精度にバラつきを生じることになるため、あらかじめ対策を講じておくことが必要である。当初、結果のバラつきを生じやすい箇所として、パンソルビンの輸送中の凍結や、RNA 精製カラムにアプライする際に添加するエタノールの量についても想定していた。前者については、意図的に凍結融解を繰り返したパンソルビンを用いても結果に影響しないことが確認された。後者については、添加するエタノールの量を段階的に変えても結果は同じであった。そこで本研究では、結果に影響を及ぼすと考えられる箇所を次の 4 点に絞り、それぞれにおいて最適化を図った。

- (1)  $\alpha$ -Amylase 粉末の不溶性成分の混入
- (2) DNase 処理にともなう RNA 分解

### (3) 逆転写反応系の最適化

### (4) PCR 反応系の最適化

最適化は結果を逐次観察しながら行う必要があるため。検討の順番はプロトコルとは逆に(4)→(1)とした((1)→(4)の検討では、最適化されていないプロセスを経た結果を見ることになり不正確)。

## 2. PCR 反応系の検討

Real-time PCR に用いる試薬の比較検討は平成 24 年度に行っていることから、本研究では conventional PCR の試薬選定と反応条件の最適化について検討した。検討にあたっては、PCR を行う直前の段階である cDNA 合成までは問題がないことを前提としなければならなかった。そこで、結果に影響が及ぶ要因を排除するために、ウイルスを含まない食品から調製したパントラ抽出物をベースとし、そこに NoV の遺伝子配列由来の DNA 断片を加えた被検体を用いた。検出感度の検討のために段階希釈試験が一般的に行われているが、ここでは蒸留水で希釈する代わりにパントラ抽出物を使うことで、大量の黄色ブドウ球菌遺伝子の存在下という負荷的条件を設定している。また、将来的に偽陽性対策も視野に入れる必要があり、偽陽性の最大のリスク要因である遺伝子解析作業(電気泳動やゲルからの切り出し精製)と両立させるために、基質として dUTP を使えるように検討を進めた。PCR で用いる酵素(DNA polymerase)は、由来によってファミリーA とファミリーB に大別される。後者には、反応中に間違った塩基が取り込まれた場合にやり直すという校正活性があるが、前者にはない。しかし、同時にファミリーB に属する酵素には dUTP を取り込めないという

性質もある。図 2A に示したとおり、dUTP を基質として用いることができる酵素はファミリー A に属するものだけであった。ファミリー A には校正活性がないため、塩基の読み間違いが発生(数万塩基に 1 つ)し、遺伝子解析の正確さが損なわれる懸念もある。しかし、通常行われている PCR 産物のダイレクトシーケンスでは、こうしたエラーはバックグラウンドノイズに包含されて顕在化しないため問題はないと考えられる。表 1 の反応系から dUTP を取り込めたものを抜き出し、さらにパントラ抽出物で負荷をかけた条件で検討したところ、図 2B に示したとおり、ホットスタート仕様が必須であった。これは、大量に存在する黄色ブドウ球菌への非特異反応を抑えることが重要であることを示している。また、基質として dUTP を使用する場合には Mg 濃度を増やす必要があることも示された。dUTP は本来の塩基である dTTP よりも取り込み率が落ちることから、反応系に 3 倍量を加えることで対応している(dTTP:200  $\mu$  M、dUTP:600  $\mu$  M)。ヌクレオチドには弱いながらもキレート効果があるため、Mg<sup>2+</sup>の実効濃度が低下する分だけ増量する必要があるものと考えられる。dUTP を用いた上で、蒸留水による段階希釈結果と同等の感度を有する反応系として、最終的に図 2C に示す 3 つが選択された。さらに利便性を考慮し、表 1 の No.12 を第一選択とした。dUTP を取り込んだ増幅断片は、Uracil-N-Glycosylase を作用させることで選択的に分解除去が可能であるため、偽陽性の防止に有効であるものと考えられる。

### 3. 逆転写反応系の検討

PCR 反応系の最適化の場合と同様に、逆

転写反応直前の段階までは問題がないことを前提として検討を行う必要があることから、NoV RNA をパントラ抽出物で段階希釈した被検体を用いた。表 2 に示した酵素を用いて逆転写反応を行った後は、最適化の済んだ real-time PCR、または conventional PCR で結果を比較検討した。表 2 に示した逆転写酵素は、至適反応温度によって 3 つに分けられる。M-MLV(モロニー・マウス・白血球ウイルス)由来の逆転写酵素は、37°C で反応が行われる(表 2 の No.1)。M-MLV 由来逆転写酵素を改変して、反応温度を 42°C に高めたものが No.2、No.3、No.5 である。一方、もともと至適反応温度が高い AMV(トリ骨髄芽球症ウイルス)由来の逆転写酵素を改変して、さらに高温反応を行えるようにしたものが No.4 と No.6 である。図 3A、図 3B、図 3C では、RNA が低濃度であるほど、高温逆転写反応が有効であることが示されている。横軸からの立ち上がりサイクルに大きな違いはないものの、縦軸の蛍光強度に差が見られることから、高温になるほど増幅効率が高くなっているといえる。図 3A のように高濃度の RNA を増幅して検体中の初期コピー数(横軸に依存)を算定しても違いが現れないが、蛍光強度が低い(増幅効率が低い)反応系では検出限界において不利となる(図 3B、図 3C)。次に高温逆転写反応の最適化を行ったところ 58°C による反応が最も増幅効率が高かった(図 4A、図 4B)。高温になるほど非特異反応は減るものの、プライマーのアニーリング効率も下がるため、総合的な増幅効率は両者のバランスで決まる。58°C という温度条件は、そのバランスの上に成り立っているものと考えられるが、高温逆転写反応が可能で酵素同士(表 2 の

No.4とNo.6)を比較したところNo.4の増幅効率が高かった(図5A、図5B)。No.4の酵素にはRNaseH活性が残存しており、No.6の酵素では除去されているという違いがある。cDNA合成後は、鋳型となったRNA鎖は不要となり、むしろPCRの効率を悪くすることからRNaseH活性が残存している方が有利であるものと考えられる。

続いて、real-time PCRを用いて行った検討内容をconventional PCRにて行い、非特異反応の程度を比較した(図6)。37°Cによる逆転写反応系では増幅バンドが認められないが、これは図3A~図3Cにおいて蛍光強度が低かった結果と一致している。42°Cの反応系では、高濃度のNoV RNAに対しては正しく増幅できるものの、低濃度では黄色ブドウ球菌の非特異増幅が優位となっている。このことは、図3B、図3C、図5A、図5Bにおいて蛍光強度が低かった理由となる。このような黄色ブドウ球菌に対する非特異反応は55°Cでは若干残るものの、58°Cでは完全になくなり、NoV遺伝子だけが効率的に増幅できている。すなわち、real-time PCRにおいて蛍光強度が高かった結果を裏付けているものと考えられる。

#### 4. DNase 処理法の検討

これまでにカキ等のウイルス検査において、カキ本体由来のDNAを除去するために逆転写反応の前にDNase処理を行うことが推奨されてきた。パントラ法で抽出されたRNAにも大量の黄色ブドウ球菌由来のDNAが混入することから、非特異反応を抑制するためにもDNase処理は有効な手法と考えられる。しかし一方で、DNase処理で一般的に用いられる酵素であるDNase Iは、反応後

の失活に75°C 5分の加熱を必要とすることから、肝心のウイルスRNAが分解・減少してしまうという難点があった(図8A、図8B)。極微量のウイルスRNAを扱う食品検査において、この問題は看過し得ないものと考えられる。また、単純に加熱を省いただけでは、残存するDNase Iによって、合成されたcDNAも損傷を受けるため根本的な解決にはなり得ない。そこで、50°Cで活性がなくなり、55°Cで不可逆的に失活する易熱性DNase (HL-dsDNase)を用いることで、75°C 5分の加熱を行わずに逆転写反応に移行することができた。このプロセスを実行するためには、先に最適化を済ませた58°Cの高温逆転写反応と組み合わせることが必須であり、42°Cの逆転写反応はcDNAが損傷を受けるため不適當である。なお、この酵素は我が国で流通していないため、ノルウェーのメーカーであるArcticZymes社から直接取り寄せる必要がある。そこで一般的に用いられているDNase Iを用いた方法として、図7に示したオンカラム処理法を考案した。パントラ法のRNA抽出工程に組み入れていることから、最も利便性が高いが、DNAウイルスであるアデノウイルスが想定されるケースでは使用できない。易熱性DNase処理とオンカラムDNase I処理のいずれにおいてもウイルスRNAの減少は認められなかった(図8A、図8B)ことから、各機関の実状に合わせて選択することが可能である。

#### 5. $\alpha$ -Amylase の不溶性成分の影響に関する検討

パントラ法では食品中の炭水化物を分解除去するために $\alpha$ -Amylase粉末を添加しているが、この粉末には賦形剤が含まれて