

いるため完全には溶解しない(図 9)。その後の工程において、3,000rpm 30 分の遠心によって食品残渣を沈澱除去する際に、この不溶性成分も一緒に取り除くことが可能であるが、そのためにはスポイトで上清を丁寧に別チューブに分離する必要がある。検体数が多い場合には、この操作はかなりの負担となり得る。しかし、デカントによって簡便に上清を分離した場合には、不溶性成分の残留は避けられず、精製カラムにアプライする直前にエタノールを添加した際に白濁を生じ(図 12A の No.2、No.3)、検出結果にも影響する(図 12B の No.2、No.3)。そこで、本研究では α -Amylase 粉末から不溶性成分を除去して液化調製(図 10)することで問題解決を図った。液化調製した α -Amylase は、粉末と同様に炭水化物を分解できることが確認された(図 11A、図 11B)。また、精製カラムにアプライする工程において白濁せず(図 12A)、検出結果もこれまでの粉末を添加する方法と同等であった(図 12B)。これらの結果は、 -20°C で 2 ヶ月間保存した後の液化調製品を用いて得られたものであり、あらかじめ十分量を調製しておいても不都合はないことを示している。カキのウイルス検査の工程にも α -Amylase 粉末が用いられているが、液化調製品に置き換えることで簡便化が図られるものと考えられる。

6. まとめと今後の課題

本研究で得られた知見を総括すると次の 4 点に集約される。第一に、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用いる方が簡便で、その後のトラブルを防止できる。第二に、黄色ブドウ球菌の DNA を除去するためには RNA 抽出時にオ

ンカラム DNase I 処理を行うか、抽出後の易熱性 DNase 処理が有効であり、いずれの方法も非加熱であることから RNA の分解・減少は起こらない。第三に、 58°C の高温逆転写反応を行うことで、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。第四に、PCR 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。

また、サポウイルス等のノロウイルス以外の食中毒起因ウイルスについてもパントラ法が適用できることがすでに明らかとなっているが、遺伝子解析まで踏み込むためには逆転写反応専用プライマーの設計を進める必要がある。

一方で、本法が普及するにつれて、実験室内汚染による偽陽性の問題が浮上してくることが想定される。本研究では効率的に遺伝子解析可能な DNA 断片を得ることができたが、それは両刃の剣であることに留意する必要がある。すなわち、遺伝子解析を積極的に実施すれば、それだけ作業環境中の PCR 増幅産物汚染が蓄積されて、新規の食品検査において悪影響を及ぼすというジレンマである。これまでは、作業する実験室を分けて、器具や試薬を分別使用するなど、実験操作を慎重に行うということ以外に積極的な偽陽性対策は取られてこなかった。しかし、食品のウイルス検査が現実的なものとなった段階では、その社会的な影響に鑑みて、一層の偽陽性対策を講じる必要があるものと考えられる。本研究により最終的に得られる DNA 断片にウラシルが含まれるようにデザインすることができたため、

Uracil-N-Glycosylase 処理による偽陽性防止策を取ることが可能である。その方法の評価は次年度の課題とする。

さらに、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る。具体的には、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、ウイルスは食品中では増えず付着するのみであることから、分取した食品サンプルに付着していなければ陰性になってしまう。そのため、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余地が残されている。

E. 結論

前年度に浮上した、試験機関ごとに検出結果がバラつくという問題に対して、精度に影響を与えると想定されるポイントについて最適化を行った。炭水化物の除去のために加える α -Amylase 粉末の不溶性成分が検出精度に影響することから、あらかじめ液化したものを調製することで対応した。DNase 処理時にウイルス RNA が分解・減少する問題については、2通りの非加熱法を考案して解決した。逆転写反応と PCR については、酵素の選択や反応系の最適化を行った。今後は、ノロウイルス以外の食中毒起因ウイルスへの対応と、実事例への適用例が増えるにつれて問題となることが予想される偽陽性の抑制が課題となる。また、サンプリングプラン等の運用面での検討も必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 斎藤博之、須藤恒久、田中智之、野田衛：食品検体からパンソルビン・トラップ法で抽出したノロウイルス RNA の検出系に関する検討、第 34 回日本食品微生物学会学術総会、2013、東京

2) 斎藤博之、東方美保、岡智一郎、片山和彦、田中智之、野田衛：パンソルビン・トラップ法によって抽出されたノロウイルス 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、2013、神戸

3) 斎藤博之、東方美保、岡智一郎、片山和彦、田中智之、野田衛：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、2013、沖縄

4) 斎藤博之、Ratigorn Guntapong、武田直和：タイ王国における食品の安全キャンペーンと、食品中のウイルス検査法としてのパンソルビン・トラップ法の導入、秋田応用生命科学研究会第 23 回講演会、2012、秋田

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

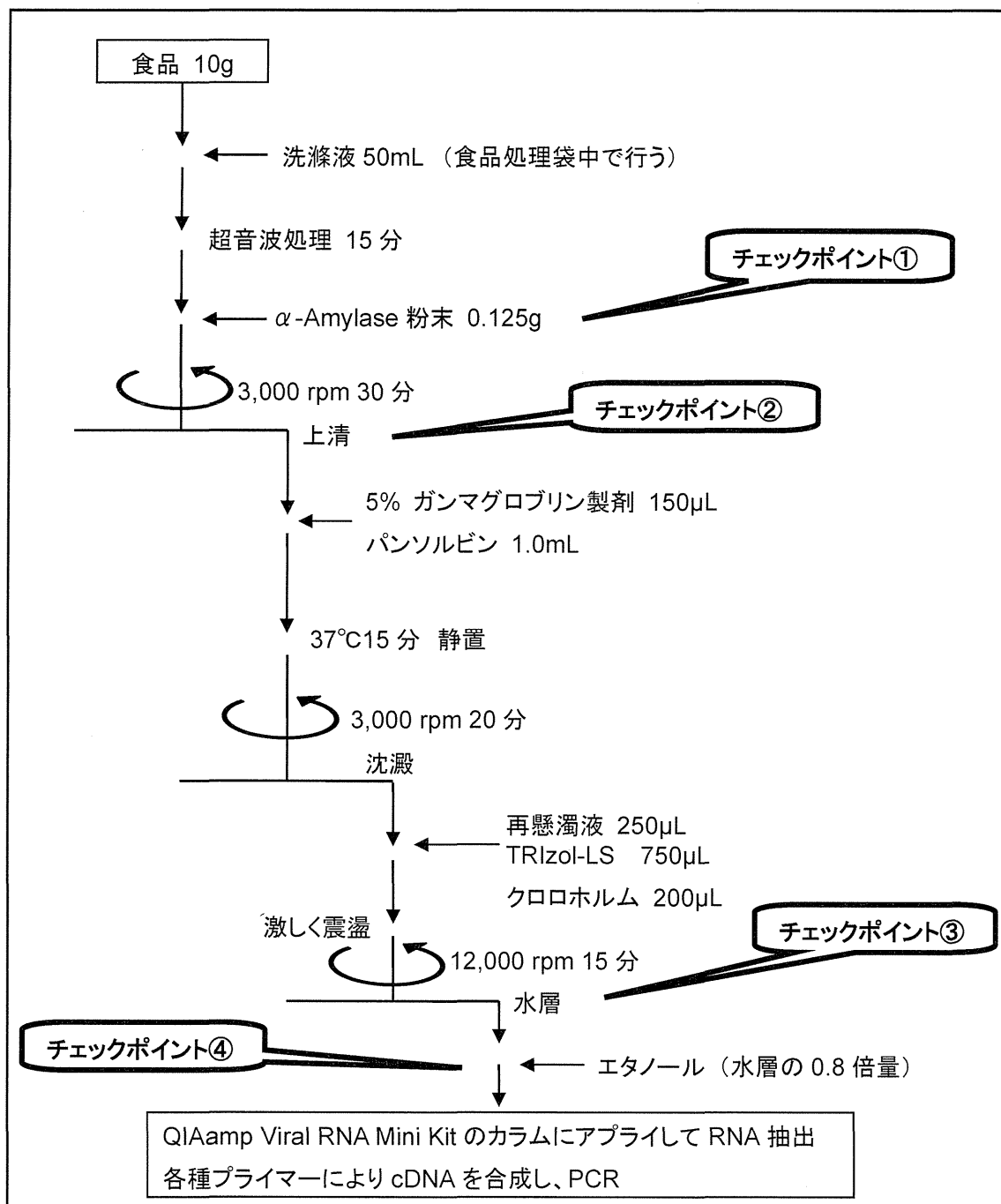


図1 パンソルビン・トラップ法の操作手順

①～④のチェックポイントはα-Amylase 液化調製法で参照する

表 1 比較検討した PCR 用酵素と反応系 (次頁へ続く)

No.	メーカー	ファミリー / ホットスタート / Mg 濃度	No.	メーカー	ファミリー / ホットスタート / Mg 濃度
	品名	(反応系への追加)		品名	(反応系への追加)
1	greiner	A / - / 1.5mM	11	Roche Diagnostics	A / H / 1.8mM
	Taq DNA Polymerase, Standard			FastStart High Fidelity PCR System	
2	greiner	A / H / 1.5mM	12	Roche Diagnostics	A / H / 2.5mM
	Taq DNA Polymerase, Hot Start			AptaTaq Fast PCR Master	(抗 Taq モノクローナル抗体添加)
3	greiner	A / - / 2.0mM	13	TaKaRa	A / - / 1.5mM
	Taq DNA Polymerase, High Yield			TaKaRa Taq	
4	greiner	A / H / 2.0mM	14	TaKaRa	A / H / 1.5mM
	Taq DNA Polymerase, High Yield			TaKaRa Taq HS	
	(抗 Taq モノクローナル抗体添加)				
5	greiner	A / H / 4.5mM	15	TaKaRa	Blend / - / 2.0mM
	Taq DNA Polymerase, High Yield			TaKaRa Ex Taq	
	(抗 Taq モノクローナル抗体添加)				
	(Mg 増量→4.5mM)				
6	greiner	Blend / - / 2.0mM	16	TaKaRa	Blend / H / 2.0mM
	Taq DNA Polymerase, High Fidelity			TaKaRa Ex Taq HS	
7	greiner	B / - / 2.0mM	17	TaKaRa	Blend / - / 3.0mM
	Pfu-X DNA Polymerase			TaKaRa Z-Taq	
8	TOYOBO	B / H / 2.0mM	18	TaKaRa	Blend / H / 3.0mM
	KOD FX Neo			TaKaRa Z-Taq	(抗 Taq モノクローナル抗体添加)
9	Agilent Technologies	B / H / 2.0mM	19	TaKaRa	B / H / 2.0mM
	PfuTurbo Cx Hotstart DNA Polymerase			Tks Gflex DNA Polymerase	
10	Roche Diagnostics	A / H / 2.0mM	20	TaKaRa	A / H / 4.0mM
	FastStart Taq DNA Polymerase			MightyAmp DNA Polymerase Ver.2	

表 1(前頁からの続き)

No.	メーカー ファミリー / ホットスタート /Mg 濃度 品名 (反応系への追加)	No.	メーカー ファミリー / ホットスタート /Mg 濃度 品名 (反応系への追加)
21	New England BioLabs A / - /2.0mM Taq DNA Polymerase with ThermoPol Buffer	27	KAPA BIOSYSTEMS A / H /4.5mM KAPA2G Robust HotStart PCR Kit, buffer A (Mg 増量→4.5mM)
22	New England BioLabs A / H /2.0mM Taq DNA Polymerase with ThermoPol Buffer (抗 Taq モノクローナル抗体添加)	28	KAPA BIOSYSTEMS A / H /1.5mM KAPA2G Fast HotStart PCR Kit
23	New England BioLabs A / H /4.5mM Taq DNA Polymerase with ThermoPol Buffer (抗 Taq モノクローナル抗体添加) (Mg 増量→4.5mM)	29	KAPA BIOSYSTEMS A / H /4.5mM KAPA2G Fast HotStart PCR Kit (Mg 増量→4.5mM)
24	Nippongene A / H /1.5mM THUNDER Taq Gold DNA Polymerase LD	30	BIOLINE A / - /2.0mM HybriPol DNA Polymerase
25	Nippongene A / H /4.5mM THUNDER Taq Gold DNA Polymerase LD (Mg 増量→4.5mM)	31	BIOLINE A / H /2.0mM HybriPol DNA Polymerase (抗 Taq モノクローナル抗体添加)
26	KAPA BIOSYSTEMS A / H /1.5mM KAPA2G Robust HotStart PCR Kit, buffer A	32	BIOLINE A / H /4.5mM HybriPol DNA Polymerase (抗 Taq モノクローナル抗体添加) (Mg 増量→4.5mM)

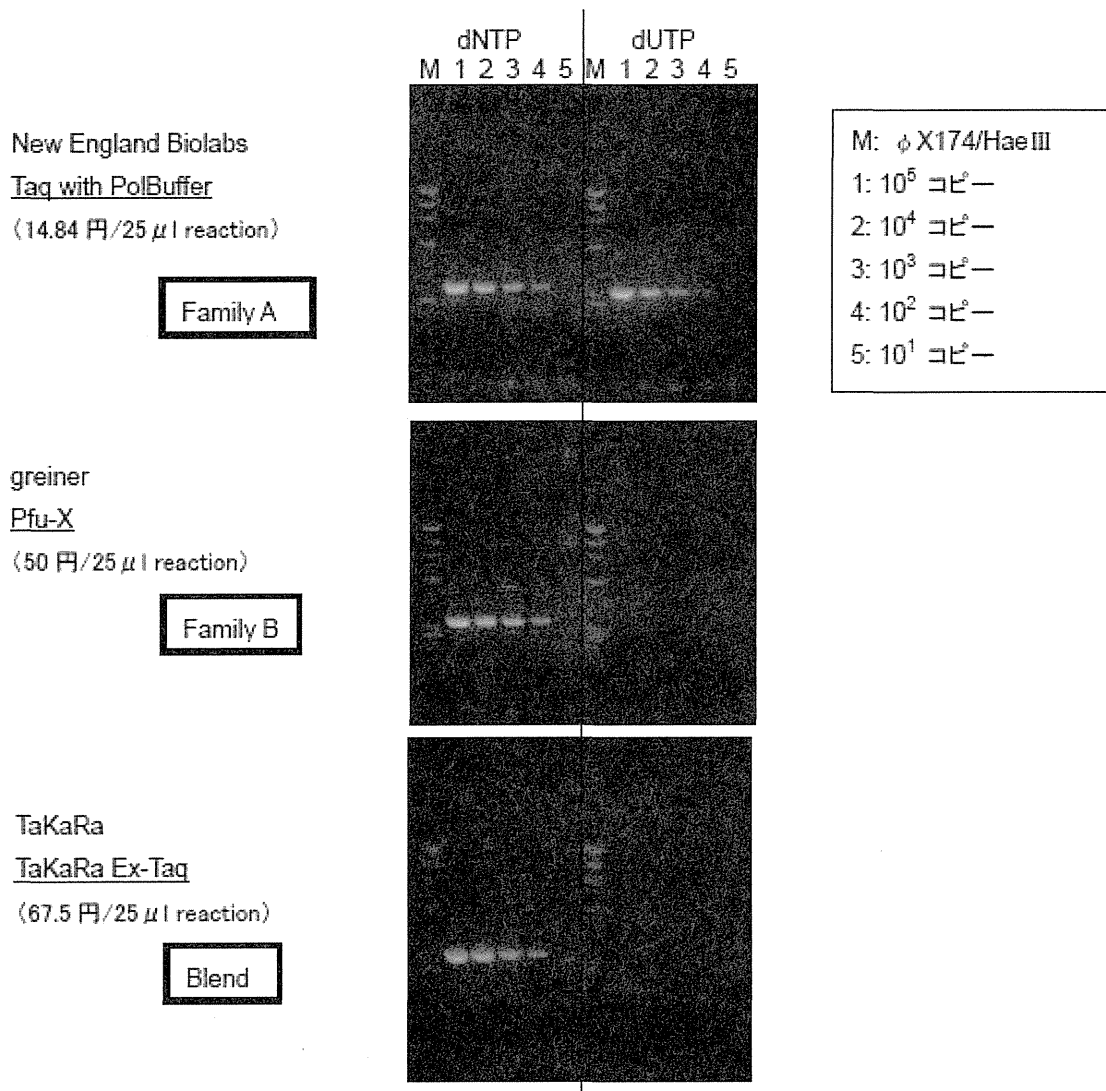


図 2A 蒸留水で段階希釈した NoV 1st.PCR 産物に対する 2nd. PCR

“dNTP”と表記してある反応は dATP、dGTP、dCTP、dTTP を各 200μ M にて使用
 “dUTP”と表記してある反応は dATP、dGTP、dCTP、を各 200μ M、dUTP を 600μ にて使用

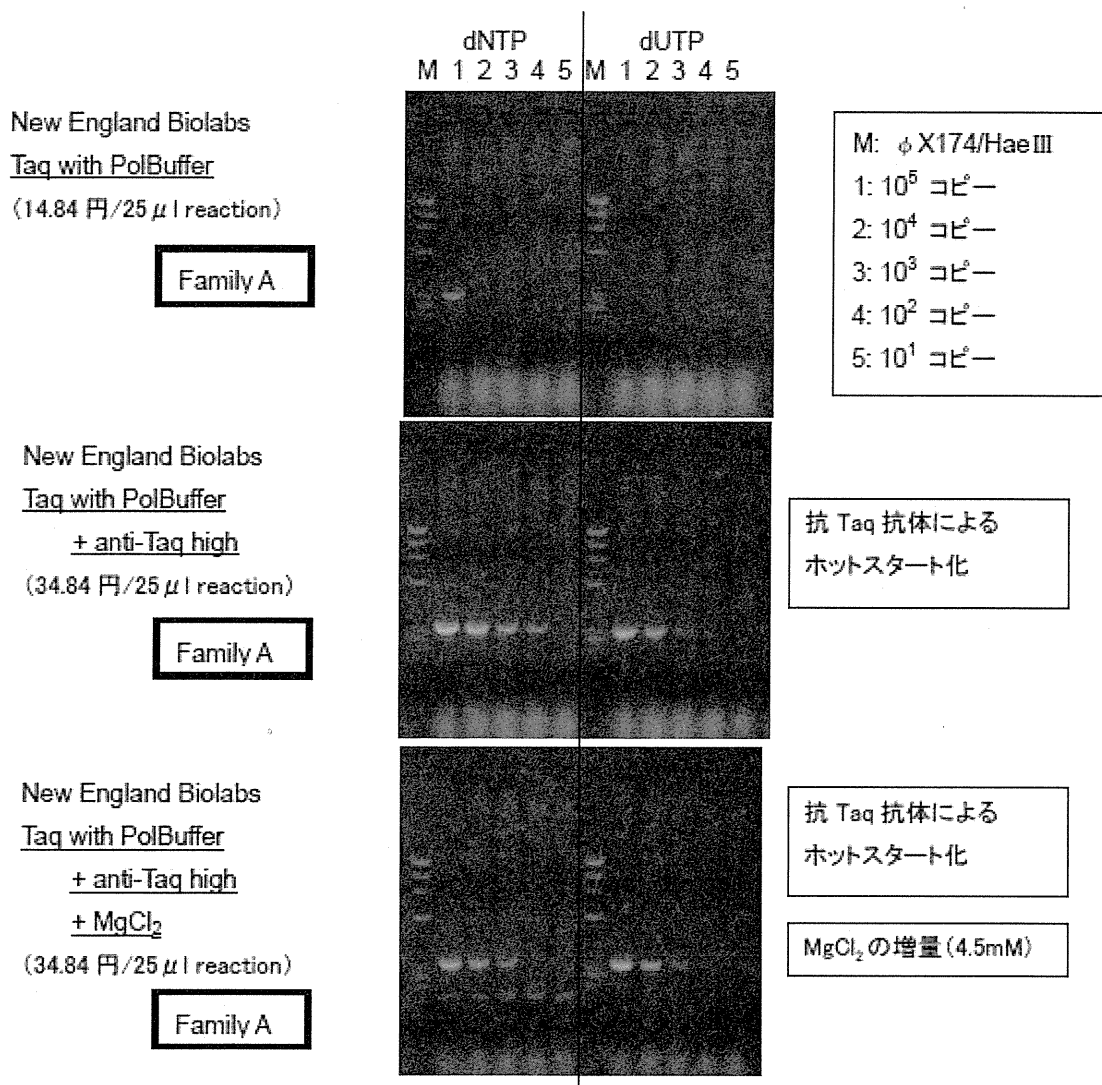


図 2B パントラ抽出物で段階希釈した NoV 1st.PCR 産物に対する 2nd. PCR (1)
 “dNTP”と表記してある反応は dATP、dGTP、dCTP、dTTP を各 200 μ M にて使用
 “dUTP”と表記してある反応は dATP、dGTP、dCTP、を各 200 μ M、dUTP を 600 μ にて使用

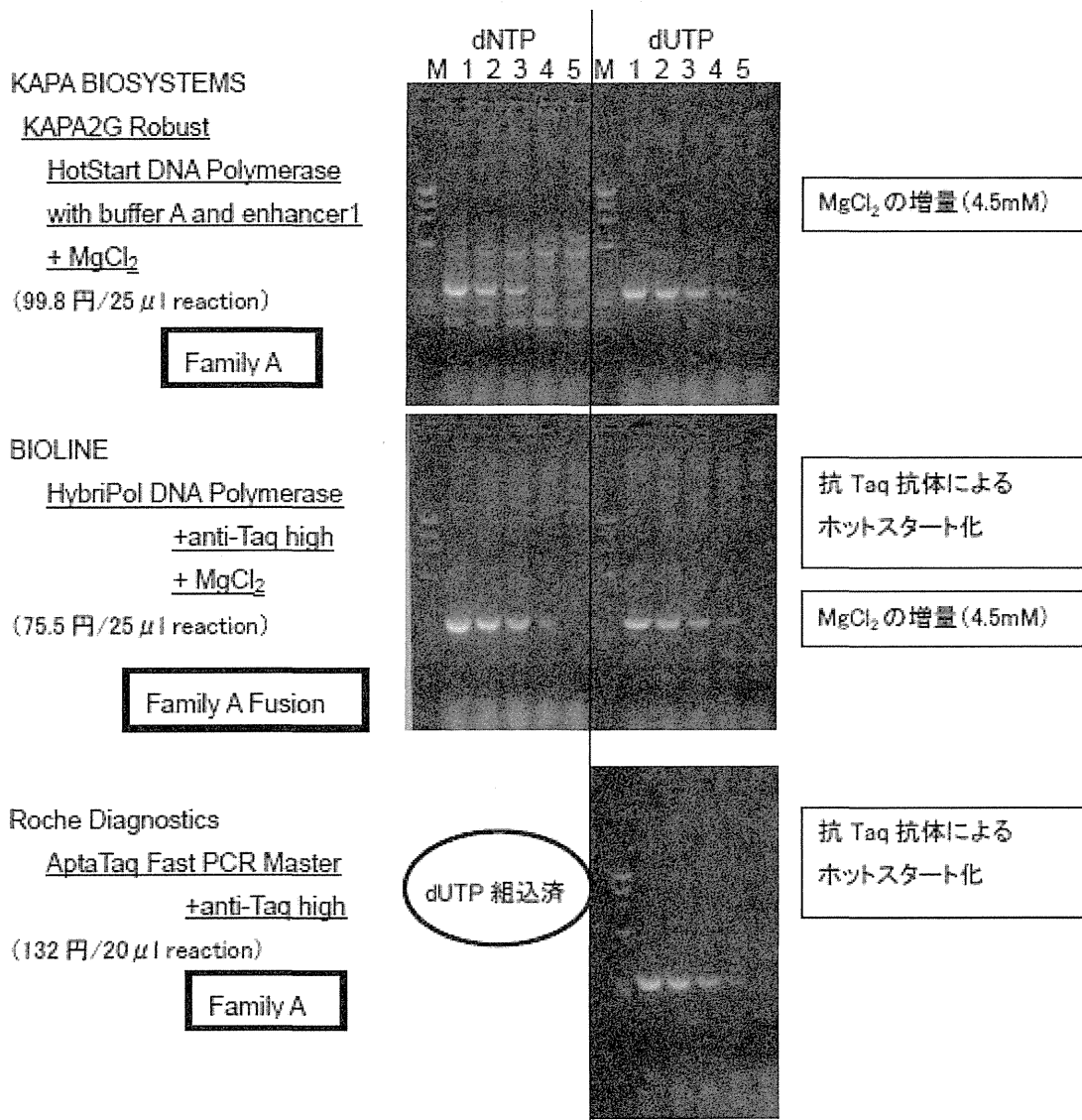


図 2C パントラ抽出物で段階希釈した NoV 1st.PCR 産物に対する 2nd. PCR (2)
 “dNTP”と表記してある反応は dATP、dGTP、dCTP、dTTP を各 200 μ M にて使用。
 “dUTP”と表記してある反応は dATP、dGTP、dCTP、を各 200 μ M、dUTP を 600 μ にて使用

表 2 比較検討した逆転写酵素と反応温度

No.	メーカー	品名	反応温度(°C)
1	New England BioLabs	M-MLV Reverse Transcriptase	37
2	TOYOBO	ReverTra Ace	42
3	TaKaRa	PrimeScript	42
4	Roche Diagnostics	Transcriptor	55~65
5	invitrogen	SuperScript II	42
6	invitrogen	Thermoscript	55~65

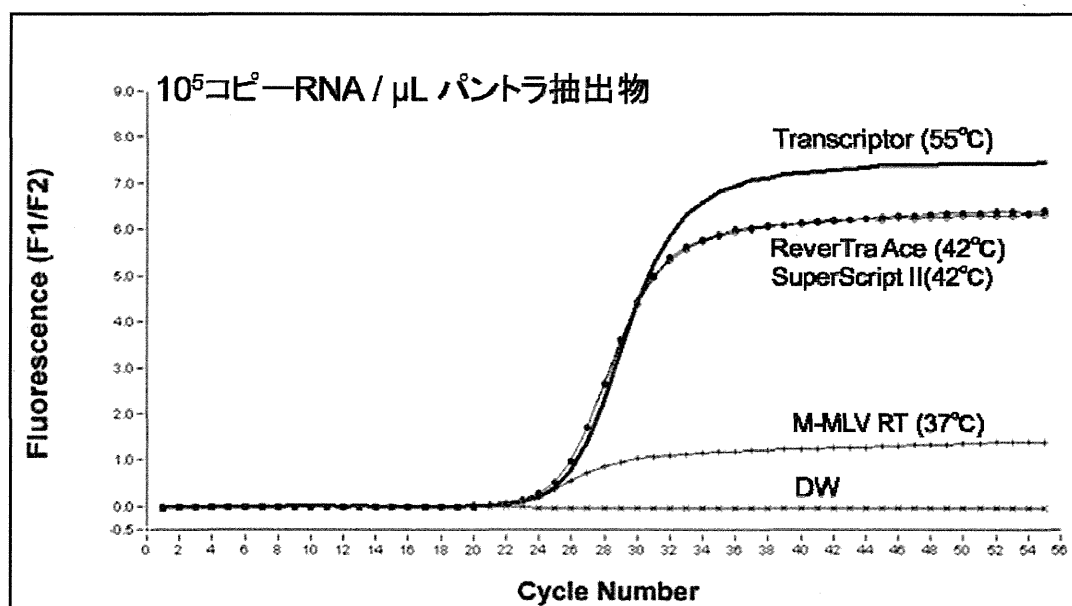


図 3A 逆転写酵素の比較 (1)

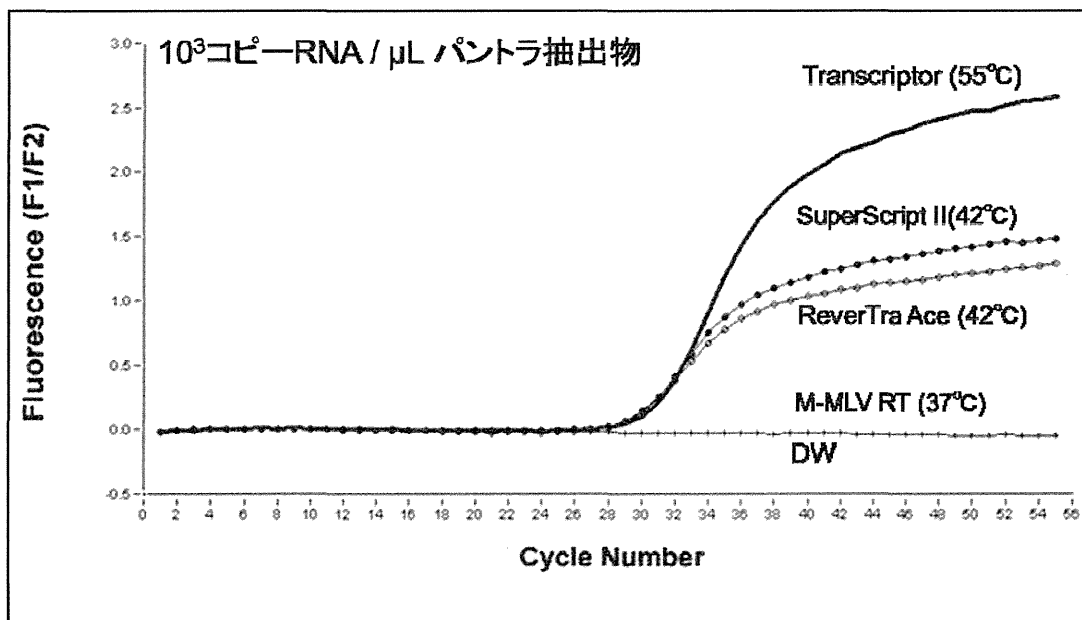


図 3B 逆転写酵素の比較 (2)

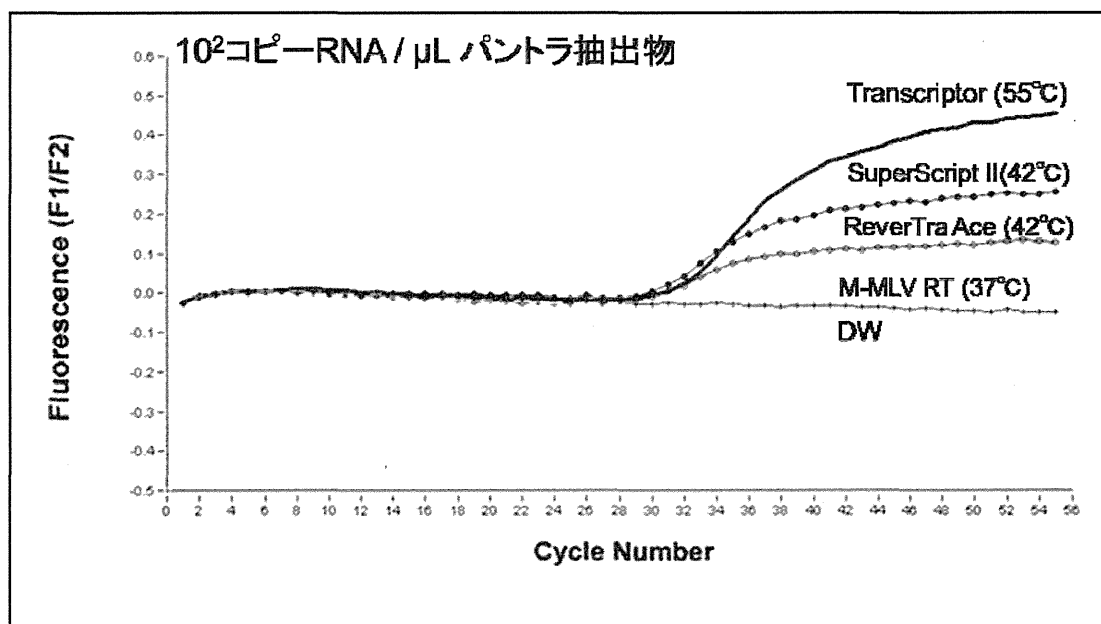


図 3C 逆転写酵素の比較 (3)

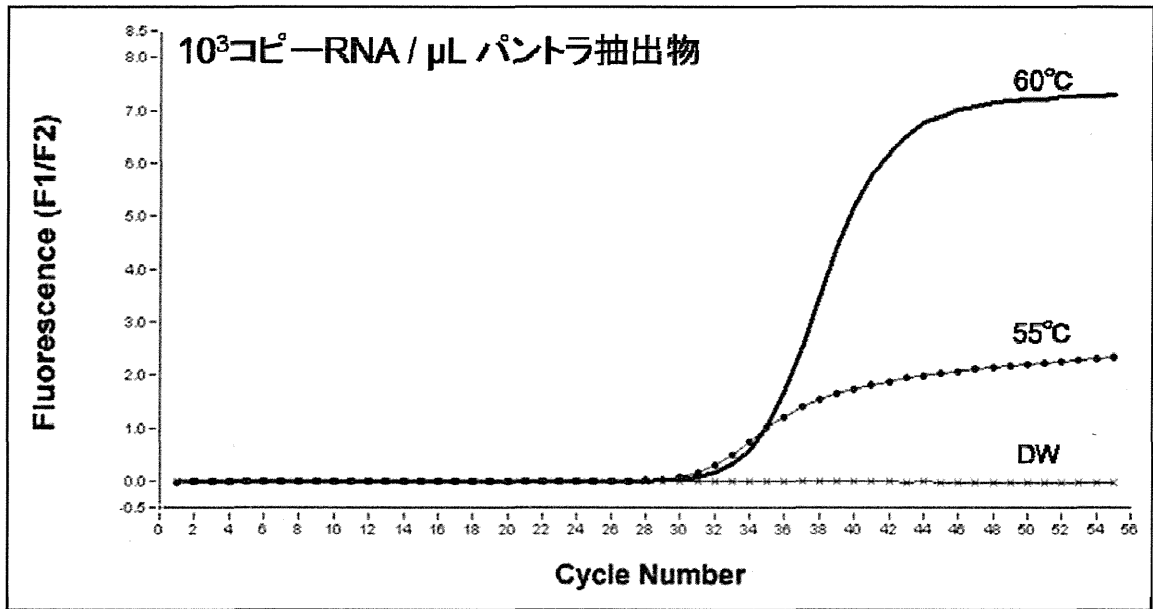


図 4A Transcriptor の反応温度比較 (1)

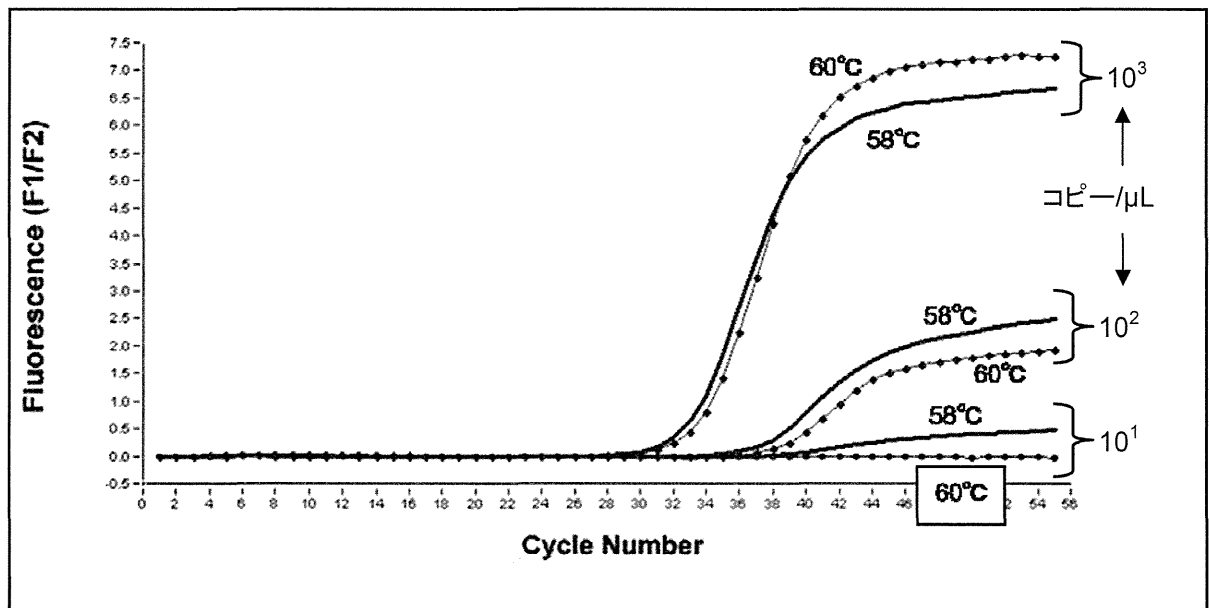


図 4B Transcriptor の反応温度比較 (2)

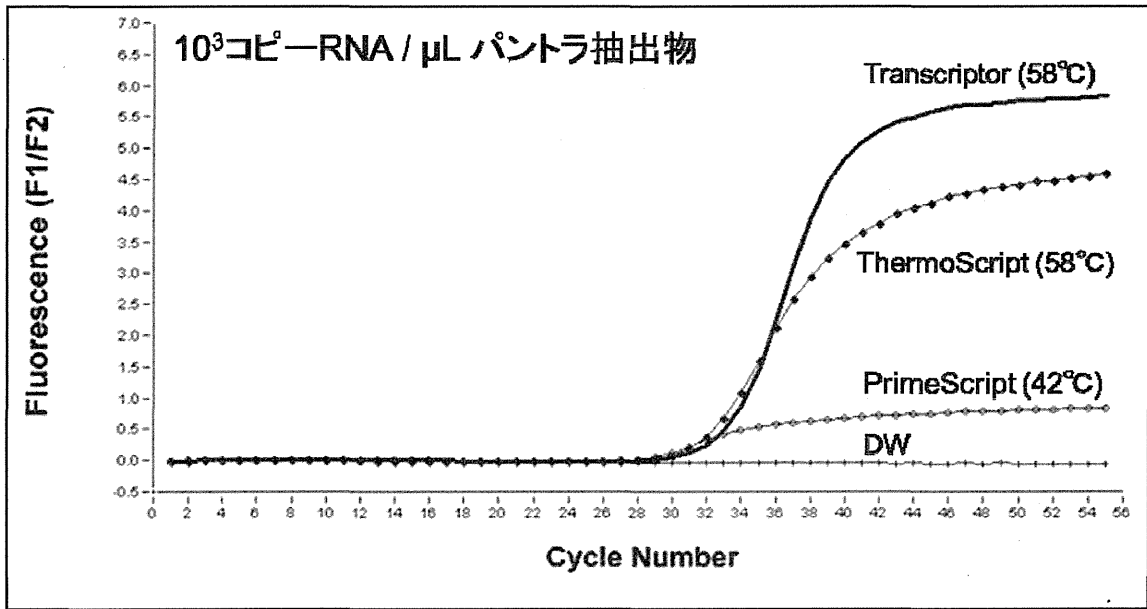


図 5A 高温逆転写酵素の比較 (1)

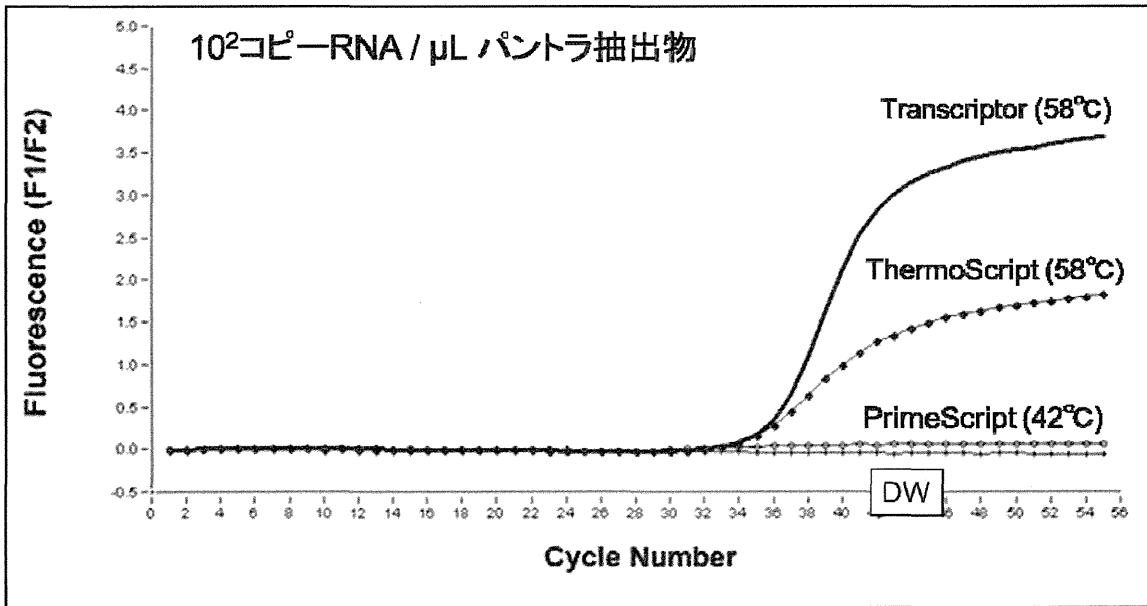


図 5B 高温逆転写酵素の比較 (2)

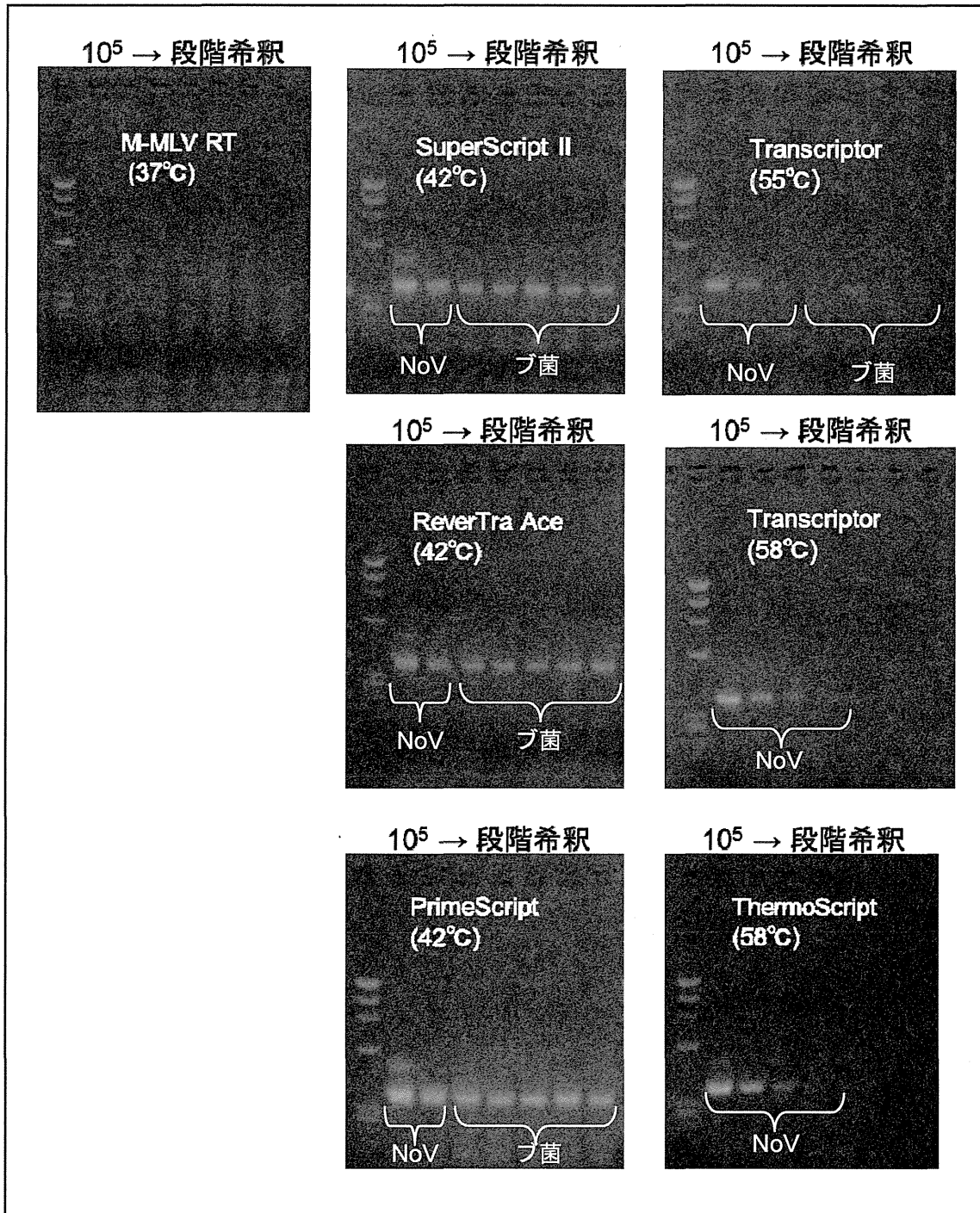


図 6 増幅バンドにおける逆転写酵素と反応温度の影響

10⁵コピー/μLのNoV RNAをパントラ抽出物で段階希釈したものを、各種酵素で逆転写し、COG2F/G2SKRのプライマーセットとAptaTaq(抗Taq抗体添加)によりPCRを行った。

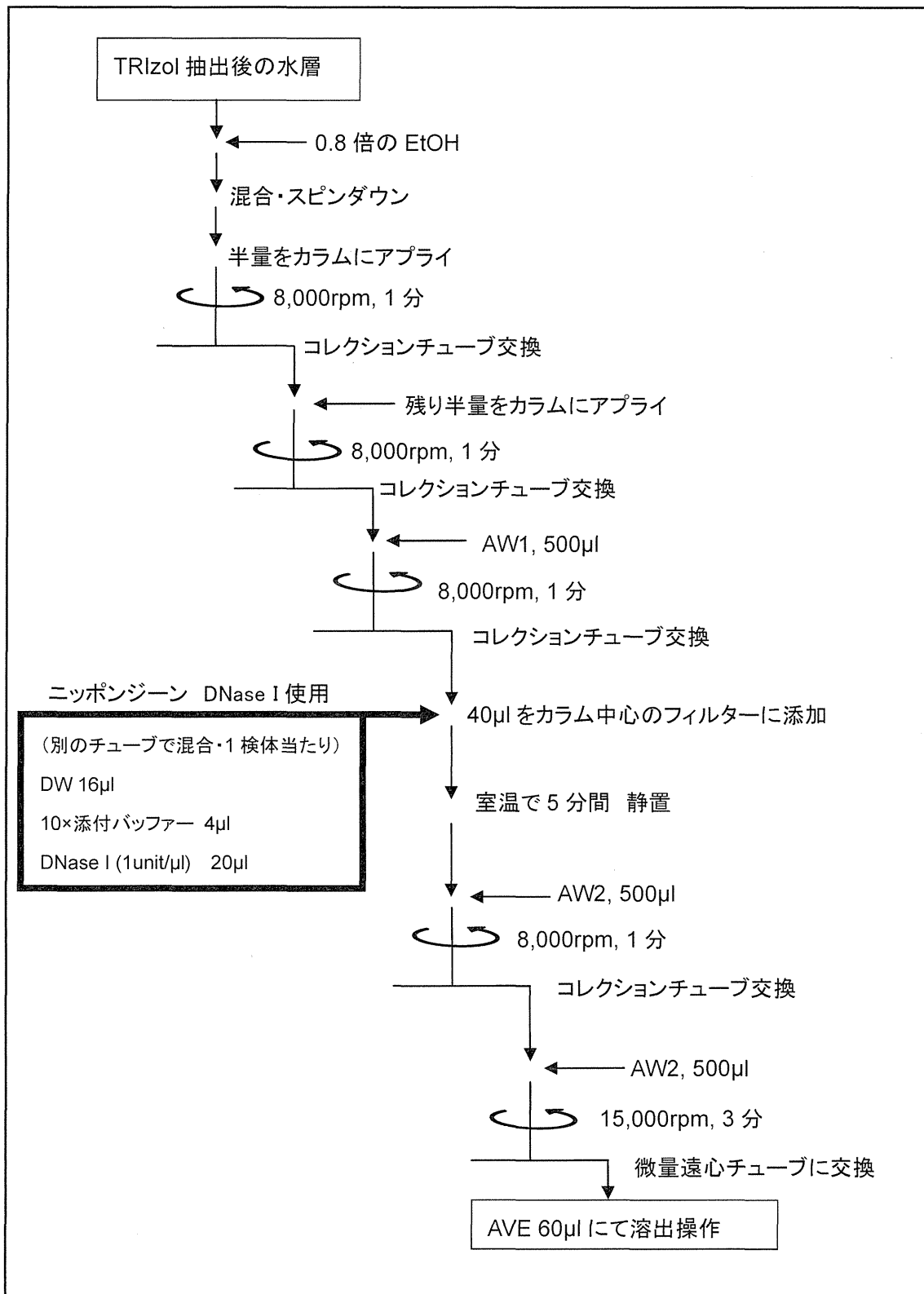


図 7 QIAamp Viral RNA Mini Kit へのオンカラム DNase I 処理の組み込み

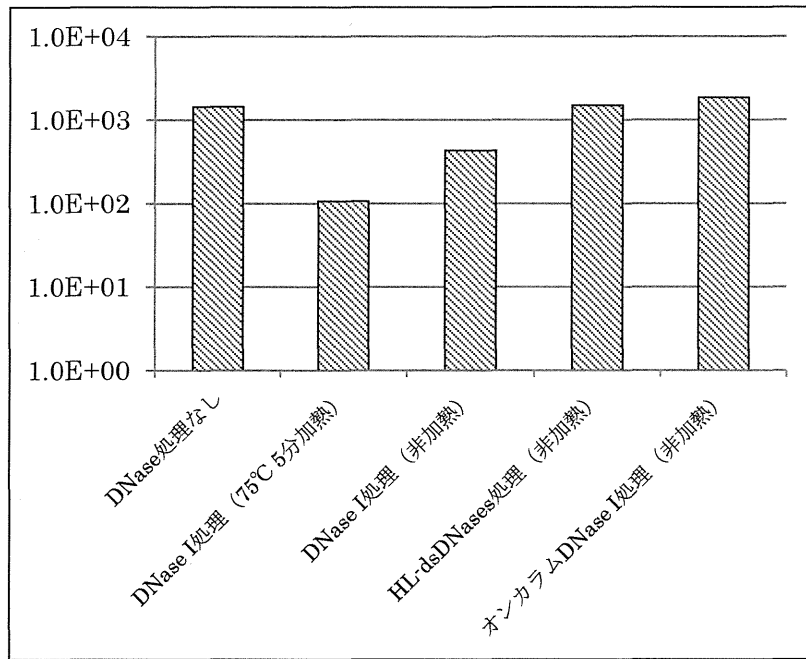


図 8A 蒸留水中の NoV RNA 量に及ぼす DNase 処理の影響

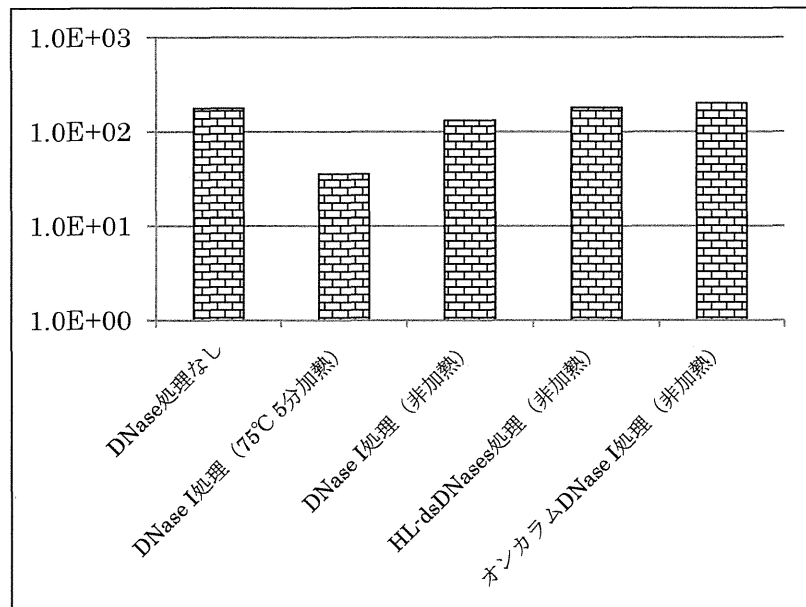


図 8B パントラ抽出物中の NoV RNA 量に及ぼす DNase 処理の影響

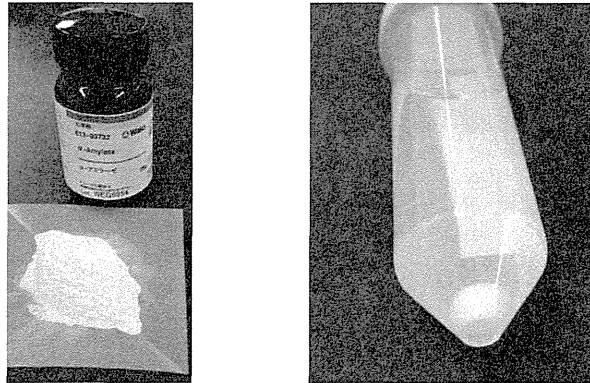


図9 α -Amylase 粉末の不溶性成分

左：図1のチェックポイント①、右：図1のチェックポイント②

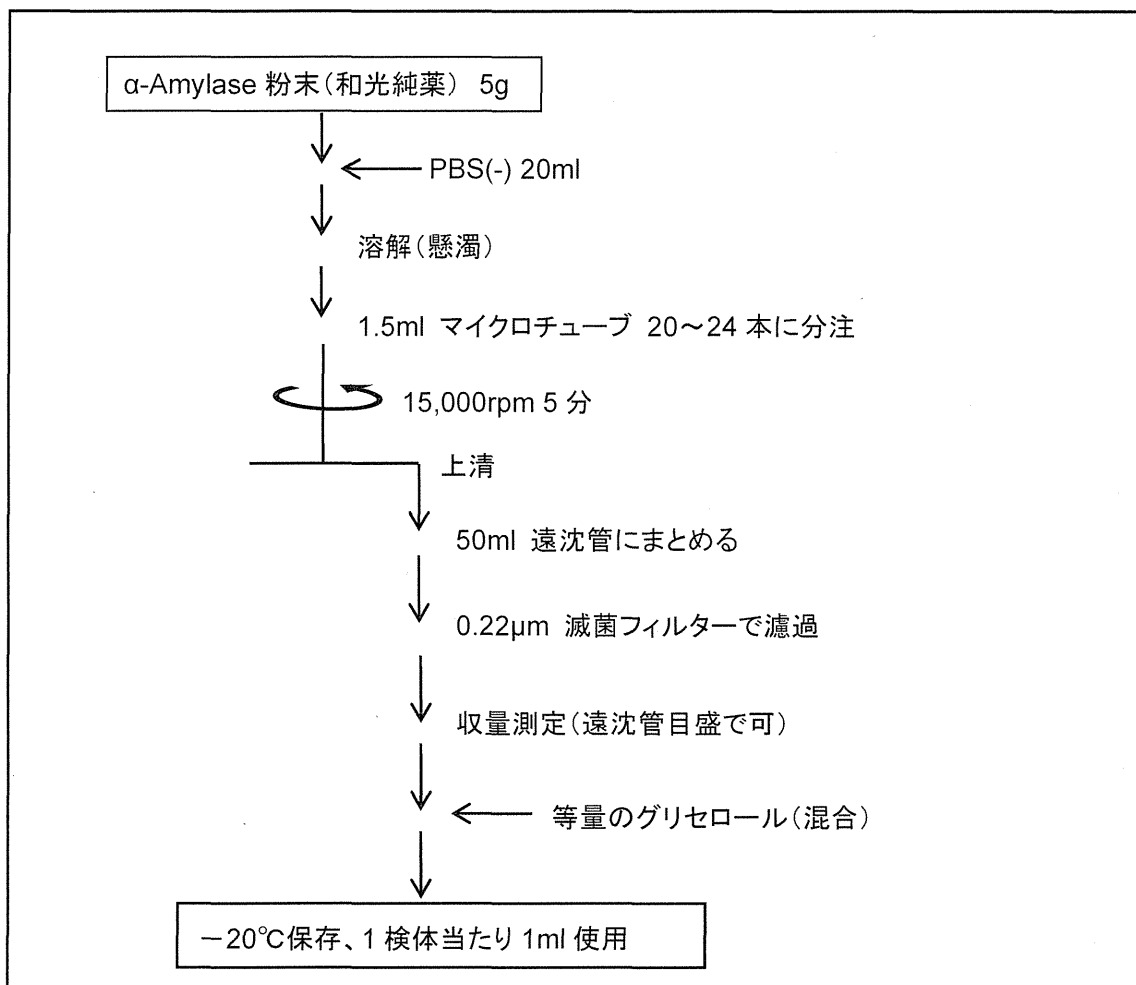


図10 α -Amylase 粉末の液化調製手順

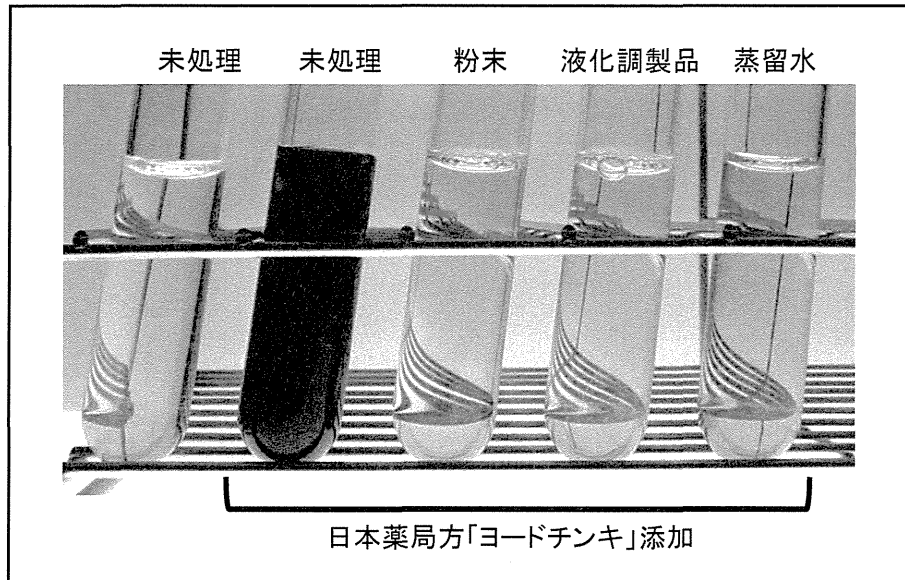


図 11A α -Amylase 液化調製品の効果の確認 (ヨウ素デンプン反応・デンプン液)

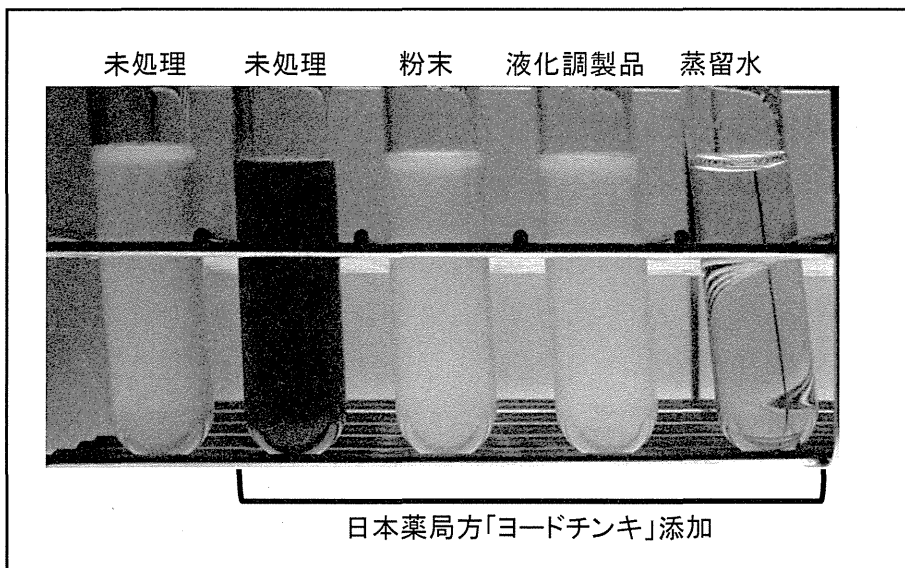


図 11B α -Amylase 液化調製品の効果の確認 (ヨウ素デンプン反応・ポテトサラダ)

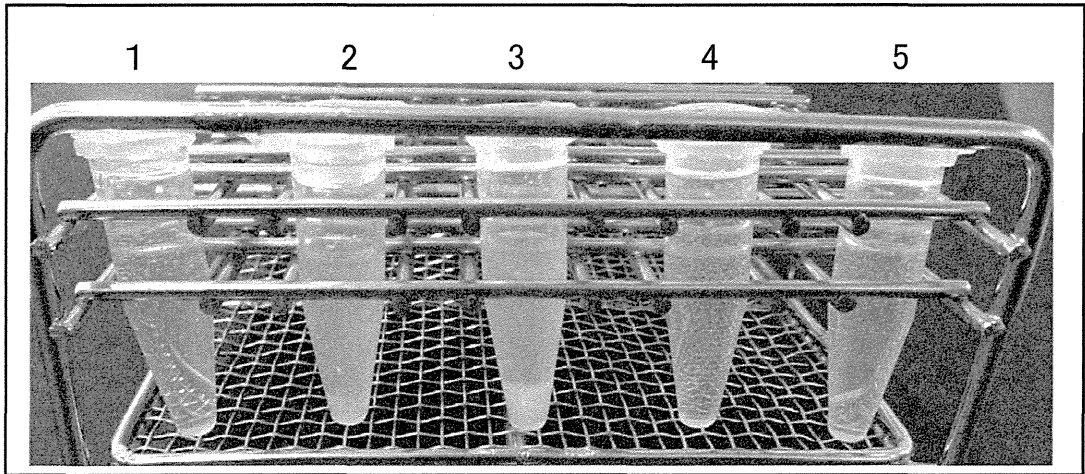


図 12A α -Amylase 液化調製品の効果の確認 (RNA 精製カラムへのアプライ時)

- 1.: 図 1 のチェックポイント①で α -Amylase 粉末を加え、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 α -Amylase 粉末を加え、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 α -Amylase 粉末を加え、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 α -Amylase 液化調製品を加え、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
- 5.: 蒸留水

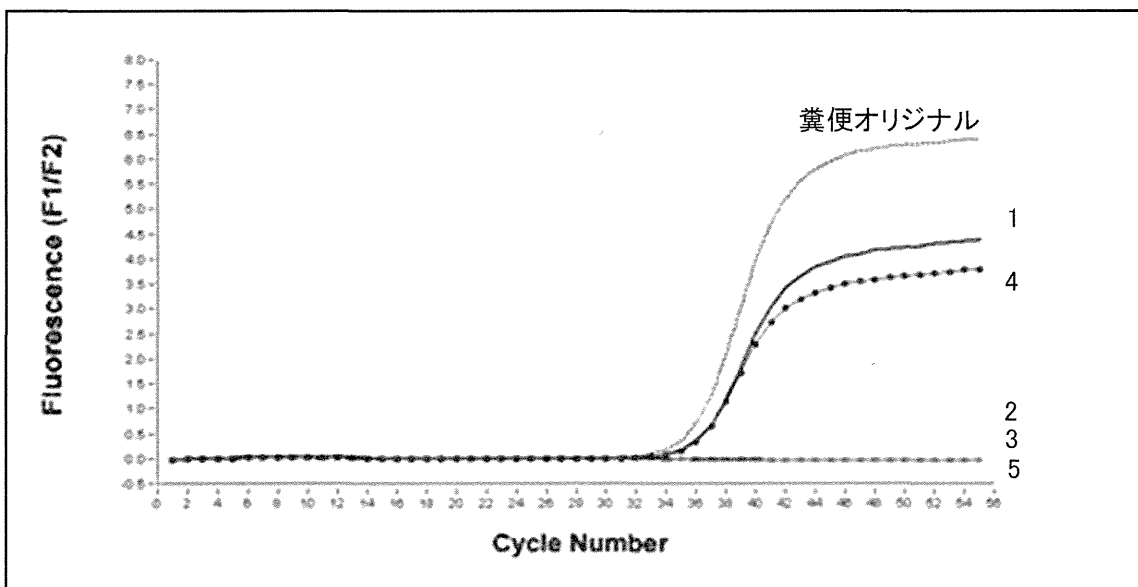


図 12B α -Amylase 液化調製品の効果の確認 (増幅曲線)

サンプル 1~5 の内容は図 12A を参照

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

研究分担者	名古屋 真弓	富山県衛生研究所
研究協力者	稲崎 倫子	富山県衛生研究所
研究協力者	板持 雅恵	富山県衛生研究所
研究協力者	嶋 一世	富山県衛生研究所
研究協力者	堀元 栄詞	富山県衛生研究所
研究協力者	小渕 正次	富山県衛生研究所
研究協力者	滝澤 剛則	富山県衛生研究所

研究要旨

富山県におけるノロウイルス (NoV)、サポウイルス (SaV) の浸淫状況を調査するため、感染性胃腸炎患者、下水流入水、岩ガキからウイルスを検出した。患者からは NoV GII. 4、GII. 12、SaV GI. 1、GI. 2 などが検出された。下水流入水からは、NoV GII. 4、GI. 4、SaV GI. 1 などが検出された。岩ガキからは NoV GI. 4、GII. 4、GII. 13 が検出され、SaV は検出されなかった。2013 年の NoV は例年と同様に NoV GII. 4 が主体であり、Sydney 2012 亜型が主流であった。NoV 陽性検体より次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子解析を試みたところ、同一検体から複数の遺伝子型が検出された。

A. 研究目的

2013 年の 1 年間に、胃腸炎患者や下水流入水からノロウイルス (NoV)・サポウイルス (SaV) を検出し、患者での流行型、不顕性感染を含めた地域の流行状況を把握した。さらに、岩ガキからも NoV、SaV の検出を試みた。これにより、2013 年のウイルス流行状況を把握するとともに、岩ガキによるウイルス性食中毒のリスクを推測することを目的とした。

また、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、それらとの因果関係が不明な事例がみられる。これは、現在行っているダイレクトシーケンシングでは主要な遺伝子型しか検出できないためと考えられる。そこで、それらの検体を材料に次世代シーケンサーを用いて網羅的に遺伝子を解析することで、少数の遺伝子型も検出し、感染源や感染経路を特定することを目的とした。

B. 研究方法

1. 2013年の患者検体

富山県において2013年1月から12月に発生した食中毒、感染性胃腸炎（集団発生例及び小児散発例）から得られた糞便または吐物を用いた。検体採取は管轄の厚生センター、保健所が行った。

糞便または吐物検体の10%乳剤上清から、厚生労働省通知（食安監発115001号）に基づきRNAを抽出し、DNase処理、逆転写反応及びPCRを行った。NoVの検出には、リアルタイムPCRを用い、PCRには、ORF1/ORF2 ジャンクション領域を対象としたプライマー1421f/G1-SKR 及び1364f/G1-SKR (GI用)、1421f/NV2oR 及び1364f/G2-SKR (GII用) (Nakamura et al., Jpn. J. Infect. Dis., 62: 394-398, 2009)を用いた nested PCR を行った。SaVの検出には、カプシド領域を対象としたプライマー SV-F11/SV-R1 及びSV-F2/SV-R2 による nested-PCR (Okada et al., Arch. Virol., 147: 1445-1451, 2002)を用いた。PCR産物から、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定した。NoVの型別判定にはカプシド領域を対象とした G1-SKF/G1-SKR、G2-SKF/G2-SKR の部分を用いた。

2. 下水流入水

県西部に位置する下水処理場において、2013年1月から11月の毎月1回下水流入水1リットルを採取した。

下水流入水を3,000rpmで30分遠心して得られた上清に、最終濃度0.05Mになるように塩化マグネシウムを添加し、0.5規定の塩酸を用いてpH3.5に調整した。この液を陰電荷膜にろ過吸着させた

後、陰電荷膜を3% beef extract 液10mlに浸漬し、ボルテックス処理により吸着分子を溶出した。溶出液を再度遠心後、回収される上清を100倍濃縮下水検体とした。また、PEG沈殿法により250倍濃縮下水検体も調整した。濃縮下水検体から、ヒト検体と同様にRNA抽出、DNase処理、逆転写反応、PCRを行った。

3. 岩ガキ

2013年4月から6月までの計5回、富山県の3漁港で採取した岩ガキ51個を用いた。

岩ガキは中腸腺を取り出したあと、同一ロット3個分を1検体としてPBS(-)にて10%乳剤にした。α-アミラーゼを加えて37°C1時間消化したのち、遠心上清を12%PEG6000及び5.8%NaClにて凝集させ遠心した。0.5% Zwittergent 加PBS(-)にて沈殿を再浮遊させ、濃縮カキ検体とした。

濃縮カキ検体から、ヒト検体と同様にRNA抽出、DNase処理、逆転写反応を行った。NoVの検出には、リアルタイムPCRとPCRを用いた。PCRは、ポリメラーゼ領域3'末端からカプシド領域を対象としたプライマーCOG1F/G1-SKR 及びG1-SKF/G1-SKR (GI用)、COG2F/G2-SKRを及びG2-SKF/G2-SKR (GII用)を用いてSemi-nested PCRを行った。SaVの検出は、ヒト検体と同様に行った。

4. 次世代シーケンサーによる遺伝子検査法の検討

富山県において2010年度から2013年度にかけて発生した胃腸炎集団発生事例において、NoVが検出されており、複数のNoV遺伝子型の混合感染が疑われる検体