

201426025A

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26年度 総括・研究分担報告書

研究代表者 野田 衛

平成27(2015)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 26 年度 総括・研究分担報告書

研究代表者 野田 衛

平成 27 (2015) 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. パンソルビン・トラップ法の普及段階における問題点の検討

斎藤 博之 他 ----- 25

#### 2. 富山県におけるノロウイルス・サポウイルス検出状況 及び胃腸炎集団発生事例の次世代シーケンサーによる解析の試み

滝澤 剛則 他 ----- 43

#### 3. ウイルスの食品検査の精度管理

渡辺 卓穂 他 ----- 53

#### 4. 食品媒介ウイルス検査の開発・標準化に関する検討

上間 匡 ----- 73

#### 5. 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 ----- 83

### III. 研究協力報告書

#### 1. 市販カキからの腸管系ウイルスの検出

吉澄 志磨 他 ----- 97

#### 2. 市販カキのノロウイルス等汚染実態調査

筒井 理華 他 ----- 103

#### 3. 養殖カキおよび下水からのノロウイルス検出

佐藤 直人 他 ----- 107

#### 4. 市販カキからのノロウイルス等の検出状況

佐藤 直人 他 ----- 111

#### 5. Nested-Realtime PCR 法を用いた市販生食用カキからのノロウイルス検出

植木 洋 他 ----- 115

#### 6. 2014年2月に購入した生カキからの胃腸炎起因ウイルスの検出法の 検討と検出状況

田村 務 他 ----- 119

#### 7. ウイルス性胃腸炎検査における SPIA (Single Primer Isothermal Amplification) 法導入に関する検討

森 功次 他 ----- 131

#### 8. 東京都におけるノロウイルス検出状況(2013年度)

宗村 佳子 他 ----- 137

9.	2013/14 シーズンのノロウイルス検出状況	小林 慎一 他 -----	141
10.	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 -----	147
11.	下水サンプルを用いた A 型肝炎ウイルス及び下痢症ウイルスの流行解析	三好 龍也 他 -----	157
12.	2014 年 2 月購入の市販カキにおけるノロウイルス検出状況	重本 直樹 他 -----	165
13.	ハイドロキシアパタイトによるカキからのノロウイルス回収法の検討	重本 直樹 他 -----	171
14.	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 -----	177
15.	2013/2014 シーズンに愛媛県で検出されたノロウイルス GII/6 の分子疫学的解析	山下 育孝 他 -----	187
16.	終末処理場流入水および市販カキからのノロウイルス検出	吉富 秀亮 他 -----	195
17.	熊本県における市販カキからのノロウイルスの検出及びサポウイルスによる散発事例の流行疫学解析	原田 誠也 他 -----	201
IV.	研究成果の刊行に関する一覧	-----	211

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 26 年度 総括研究報告書

研究代表者 野田 衛

平成 27 (2015) 年 3 月

平成 26 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

食品からのウイルス検出法の開発として、パンソルビン・トラップ法で使用するガンマグロブリンとして工業用のものを用いることにより検査の汎用化が図れた。また、検体の相互汚染防止策として、dUTP と UNG の組み合わせによる DNA 汚染の無効化と、2nd. PCR に real-time PCR を用いて Ct 値で判別する方法が有効であった。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、カキの安全性確保が困難と思われた。網羅的ゲノム解析法を用いて、ノロウイルス陽性便から直接得た RNA を分析した結果、ダイレクトシーケンス法で得られた遺伝子型と異なる遺伝子型のリードが得られる場合があった。A 型肝炎ウイルス、メンゴウイルス、コクサッキーB5 型ウイルスの PCR 用の陽性コントロールプラスミドを作製した。A 型肝炎ウイルスの長鎖 DNA (約 670 塩基)を検出するサイバーグリーン検出系リアルタイム PCR 法の条件を決定した。カキからのウイルス検出に、特異性の高い逆転写反応と PCR 増幅を行うことで、特異的な遺伝子増幅ができた。混合波形を示す検体について配列特異的シーケンス用プライマーを用いることで、遺伝子型を決定することができた。ハイドロキシアパタイトを用いた回収法で清浄検体からは高率よくウイルスを回収できたが、カキ乳剤からの回収率は低かった。

#### (2) 変異株等早期検出のための食品・環境のサーベイランス

2014 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。汚染量は GII が高い傾向にあった。ヒトでの流行を反映し GII/4 Sydney2012 変異株、GII/6 が多く検出されたが、ヒトからの検出が少ないものを含め多くの遺伝

子型のノロウイルスが検出された。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型肝炎ウイルスは不検出であったが、下水からA型肝炎ウイルスが検出されたことから、汚染リスクがあることが示唆された。食品媒介ウイルスのヒトや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、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。下水からA型肝炎ウイルスが検出され、地域に感染者が存在していたことが示唆された。2013/14 シーズンにおけるノロウイルスの主な流行株はGII/4 Sydney2012 変異株、次いでGII/6であった。GII/6はPo1領域がGII.P3のキメラウイルスであり、小児施設での集団発生が多くみられた。GII/3, GII/2等の流行も一部の地域で確認された。

### (3) 食品のウイルス検査の精度管理体制の確立

12機関を対象として、共通試料を配布することにより外部精度管理を行った。陽性試料については検量線作成時のcDNA溶液の種類間で低濃度試料の換算量の平均に有意差が認められた。また、配布cDNAは機関cDNAより濃度のばらつきが少ないことが確認された。

#### 研究分担者

齋藤 博之	秋田県健康環境センタ ー	佐藤 直人	岩手県環境保健研究セ ンター
滝澤 剛則	富山県衛生研究所	高橋 雅輝	同上
渡辺 卓穂	財団法人食品薬品安全 センター秦野研究所	齋藤 幸一	同上
上間 匡	国立医薬品食品衛生研 究所	植木 洋	宮城県保健環境センタ ー
		木村 俊介	同上
		田村 務	新潟県保健環境科学研 究所

#### 研究協力者

秋野 和華子	秋田県健康環境センタ ー	青木 順子	同上
稲崎 倫子	富山県衛生研究所	森 功次	東京都健康安全研究セ ンター
名古屋 真弓	同上	宗村 佳子	同上
嶋 一世	同上	永野 美由紀	同上
長谷川 澄代	同上	木本 佳那	同上
吉澄 志磨	北海道立衛生研究	林 志直	同上
筒井 理華	青森県環境保健センタ	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
山元 誠司	同上
改田 厚	同上
阿部 仁一郎	同上
久保 英幸	同上
三好 龍也	堺市衛生研究所
内野 清子	同上
岡山 文香	同上
芝田 有理	同上
吉田 永祥	同上
田中 智之	同上
小林 和夫	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
谷澤 由枝	同上
久常 有里	同上
山本 美和子	広島市衛生研究所
田中 寛子	同上
瀧口 由佳理	同上
藤井 慶樹	同上
京塚 明美	同上
石村 勝之	同上
山下 育孝	愛媛県立衛生環境研究 所
溝田 文美	同上
吉富 秀亮	福岡県保健環境研究所
芦塚 由紀	同上
原田 誠也	熊本県保健環境科学研 究所
吉岡 健太	同上
戸田 純子	同上
大迫 英夫	同上
飯塚 節子	島根県保健環境科学研 究所

(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非常に困難である。最近では遺伝子の変異し検出できない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。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。

本研究は (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・環境のサーベイランスおよび 3) 食品のウイルス検査の精度管理体制の確立を目的とする。

## B. 研究方法

### 1. 食品等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・トラップ法の汎用化に向けた検討

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、医薬品ではない工業用ガンマグロブリンの有用性について、医療用ガンマグロブリンと回収率を比較した。

実験室内での相互汚染対策防止を目的



として、dUTP と UNG (Uracil-N-Glycosylase) の組み合わせによる DNA 汚染の無効化と、2nd. PCR に real-time PCR を用いて、Ct 値をもって判別する方法を検討した。

## (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

網羅的ゲノム解析のノロウイルス食中毒調査への適応に向けた基礎的な研究を実施した。患者便から直接 RNA 抽出して得た cDNA 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、得られた遺伝子型を PCR 産物のダイレクトシーケンス法でえられた遺伝子型と比較した。

## (3) 食品のウイルス検査に使用する陽性コントロールの作製

食品のウイルス検査体制の確立を目的として、厚生労働省通知法の他、ISO/TS 15216-1:2013 および感染性推定遺伝子検査法の検査を行う際の陽性コントロールの作製を行った。

## (4) A 型肝炎ウイルスの新規リアルタイム PCR 検出系の開発に向けた検討

A 型肝炎ウイルスの RT-PCR として有用性が確認されている増幅系について、サイバーグリーンを用いたリアルタイム PCR を検討した。

## (5) カキからのノロウイルス遺伝子検出法および検出ウイルスの遺伝子型別法の検討

市販カキを対象として、リアルタイム PCR 法と nested PCR 法あるいは nested realtime PCR 法による検出率等を比較した。

食品からのノロウイルス検出に使用さ

れる配列特異プライマーおよびサポウイルス、アストロウイルス、アイチウイルスの配列特異プライマーと高温で反応できる逆転写酵素を使用した特異性の高い逆転写反応および特異性の高い酵素を用いた PCR 法を検討した。また、ダイレクトシーケンス法で GII の混合波形を示す検体についてシーケンス用プライマーを用いての塩基配列の決定を試みた。

ウイルス RNA を逆転写する際に一連の反応として cDNA を増幅させる SPIA 法についてウイルス性胃腸炎検査に導入が可能か検討した。

ハイドロキシアパタイトを用いたカキからのノロウイルス回収法について検討した。

## 2. 変異株等早期検出のための食品・環境のサーベイランス

### (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検索を実施した。

特に、全国 10 地方衛生研究所の協力を得て、2014 年 2 月に市販カキを購入し、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

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、散发例等からのウイルス検出、検出ウイルスの遺伝子解析を行うとともに、その疫学的な実態を把握した。

(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

食品のノロウイルス検査の精度管理体制の確立を目的として、12機関を対象として、外部精度管理を行った。陽性試料4種(高濃度2種、低濃度2種)、陰性試料1種および標準cDNA溶液を調査試料として配布し、定量検査を各検査機関にて実施した後、回収した結果について解析を行った。検査方法は指定した共通の方法とした。また、検量線作成に使用するcDNA溶液は各機関で通常使用しているものと配布した共通のもの2種とした。

#### (倫理面への配慮)

本研究において、ヒトから提供を受けた検体(便検体)は感染症法に基づく感染症発生動向調査、食品衛生法に基づく食中毒原因究明調査等の行政検査として採取されたものである。その試料の取り扱いに関しては、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。また提供試料、個人情報を厳格に管理、保存した。一部の研究においては各研究機関において研究倫理審査委員会に申請し、承認を得た。

## C. 研究結果

### 1. 食品等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・トラップ法の汎用化に向けた検討

工業用ガンマグロブリンの添加量を検討したところ、5%ガンマグロブリンを150  $\mu$ L 添加する条件で最適化された。最適化された添加量の工業用ガンマグロブリンを用いて、GI/4、GI/6、GII/2、GII/4及びGII/6のノロウイルスについて医療用ガンマグロブリンを用いた際の回収率と比較したところ、全てにおいて両者は同等であった。

Tの塩基がUに置換されたPCR産物は、UNGで処理することで特異的に分解され、以後の結果判定に影響しなくなることが示された。また、2<sup>nd</sup> PCRでリアルタイムPCRを用いた場合においても、UNG処理によってUを含んだ増幅産物が検出されなくなった。さらに、UNG処理を行わない場合には増幅曲線が認められたが、10サイクル未満の非常に早い段階で立ち上がった。

(斎藤研究分担報告)

#### (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

ノロウイルスが検出された糞便乳剤8検体について、乳剤の遠心上清から直接得たcDNAについて網羅的ゲノム解析を実施した。ノロウイルスのリード数は全体の0.03~2.69%、ウイルスのリード数の1.5~98%を占めた。ダイレクトシーケンス法で遺伝子型別ができた7検体のうち1検体ではダイレクトシーケンスと網羅的ゲノム解析で得られた主要遺伝子

型が異なった。ある検体では網羅的ゲノム解析により複数のノロウイルス遺伝子型が検出され、サポウイルスやアイチウイルスも検出された。

(滝澤研究分担報告)

### (3) 食品のウイルス検査に使用する陽性コントロールの作製

A型肝炎ウイルス(新規 nested PCR 増幅系:HAV-JCT-2FおよびHAV-JCT-1R-A), メンゴウイルス(ISO/TS 15216-1:2013 記載のリアルタイムPCR増幅系:Mengo+16-35およびMengo-629-607, 感染性推定遺伝子検査法増幅系:MengoFW4176-4197およびMengoRV5777-5797), コクサッキーB5型ウイルス(感染性推定遺伝子検査法増幅系:CoxB5 +3609およびCoxB5 -4837)に用いて各ウイルスをPCR増幅後, クローニングを行い陽性コントロールを作製した。A型肝炎ウイルス用プラスミドにはFlag配列を挿入した。

(上間研究分担報告)

### (4) A型肝炎ウイルスの新規リアルタイムPCR検出系の開発に向けた検討

FLAG配列入りHAVプラスミドを用いて, サイバークリーン系リアルタイムPCRの検討を行った。SYBR® Premix Ex Taq™ II (タカラバイオ)を用いてサイクルステップ, 伸長時間等のリアルタイムPCR条件の検討を行った結果, キット説明書に従った2ステップサイクルのPCR条件では十分な増幅が得られなかったが, 3ステップサイクルでPCRを行った結果,  $10^5$ コピーから $10^2$ コピーまで検出された。また, KOD SYBR® qPCR Mix (東洋紡), Hotstart 酵素を使用するFastStart Universal

SYBR Green Master (ROX) (Roche)でも同様の結果が得られた。2社のリアルタイムPCR装置Thermal Cycler Dice® Real Time System II (タカラバイオ)およびApplied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (ABI)を用いてPCR増幅を行った結果, m両機種による結果はほぼ同等であった。

(上間 匡 研究分担報告)

### (5) カキからのノロウイルス遺伝子検出法および検出ウイルスの遺伝子型別法の検討

2011年11月~2014年12月に採取され市販生食用カキ765検体を対象として, 通知法の定量PCR法によるノロウイルスの検査を実施した。陽性基準(2ウェル中2ウェル共に10コピー以上)を満たす検体はなかったが, 176検体において増幅曲線が認められた。それらについて nested リアルタイムPCRを行った結果, 38検体(21.6%)が陽性となった。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, 検出率は一致する傾向にあったが, リアルタイムPCR法陽性で nested リアルタイムPCR法陰性となるケースもあった。

(植木研究協力報告)

カキからのノロウイルスや他の胃腸炎ウイルスの検出に, 一般食品からのノロウイルス検出法の技術を応用した検出を試みた。特異性の高い高温での逆転写反応とPCR増幅を行うことで, 非特異的増幅産物が少ない増幅を行うことができた。また, ダイレクトシーケンス法でGIIの混合波形を示す検体について, シークエンス用プライマーを用いて塩基配列の決定を試みたところ, GII/4 Sydney 2012

と GII/6 の遺伝子型を同定することができた。

(田村研究協力報告)

ウイルス培養上清希釈液やウイルス添加カキ乳剤について SPIA 法を検討した結果、検出値の向上が確認された。しかし、カキ乳剤における結果からアミラーゼなどを用いる前処理が本反応を有効に作用させるために必要であると推察されたことから、検査対象とする食品試料に応じた前処理の選択および条件設定が必須であると思われた。

(森研究協力報告書)

ハイドロキシアパタイトによるカキ乳剤からの回収率は 2%未満で、N-アセチル-L-システイン処理を組み入れても 5%程度であった。一方、患者便の希釈検体を用いた場合は、 $10^3$  コピー程度のウイルス量があれば 50%以上の回収率が得られ、また  $10^2$  コピー程度でも nested PCR 法で検出可能であった。

(重本研究協力報告)

## 2. 変異株等早期検出のための食品・環境のサーベイランス

### (1) カキにおける食品媒介ウイルスの汚染実態調査

富山県において、2014 年 4 月～6 月に 3 漁港で採取した岩ガキ 51 個について検査した結果、1 検体からノロウイルス GII/6 が検出された。また、同年 1 月～12 月 (月 1 回) に採取した下水流入水から ノロウイルス (GI/8, GII/4 等)、サポウイルス (GII.1 等) が検出された。

(滝澤研究分担報告)

北海道において、2014 年 2 月上旬に加工された国産の市販生カキ; 8 海域(ロッ

ト)を対象に、1 ロットあたり 6 検体について 4 種類の食品媒介ウイルスの検索を行った。生食用カキでは 7 ロット中 6 ロットからヒト型ノロウイルスが検出されたが、各ロットの陽性率は 1/6～6/6 と大幅な差がみられた。加熱用カキ 1 ロットの陽性率は 5/6 と高かった。主要なから検出遺伝子型は GII/4 Sydney2012, 次いで GII/6 であった。サポウイルスは生食用 1 ロット 1 検体から検出されたのみであり、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。

(吉澄研究協力報告)

青森県において、2014 年 2 月に購入した市販生カキ 15 検体についてノロウイルス、サポウイルス、A 型肝炎ウイルスの検出を行ったが、いずれも陰性であった。

(筒井研究協力報告)

岩手県において、2014 年 2 月に購入した国産の市販カキ 7 ロット 48 検体を対象に、4 種類の食品媒介ウイルスの検索を行った。その結果、ノロウイルスが 5 ロット 12 検体から検出され、サポウイルス、A 型肝炎ウイルス、E 型肝炎ウイルスは全て陰性であった。ノロウイルスの検出率は、生食用カキが 15.4% (4/26)、加熱用カキが 40.9% (9/22) で、加熱用カキが高い傾向を示した。検出遺伝子型は GII/4 が 78% (7/9) と最も多く、いずれも Sydney 2012 変異株であった。

(佐藤研究協力報告)

新潟県において、2014 年 2 月に市販されていた生カキ 6 ロット (生食用カキ 3 ロット、加熱加工用カキ 3 ロット) 18 検体についてノロウイルス、サポウイルス、アストロウイルス、アイチウイルスについ

て検索した。ノロウイルス GI は 3 ロット 4 検体から、ノロウイルス GII は 6 ロット 14 検体から検出された。5 ロット 11 検体から II/4 2012 Sydney 変異株が、5 ロット 9 検体から GII/6 が検出された。サポウイルス (GI. 2) は 2 ロット 2 検体、アストロウイルスは 4 ロット 9 検体、アイチウイルスは 4 ロット 7 検体から検出された。

(田村研究協力報告)

大阪市において国産市販生カキ 7 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。1 ロットからノロウイルス GI/4 および GII. 17 が検出されたが、他のウイルスは検出されなかった

(入谷研究協力報告)

広島県において、2014 年 2 月に購入した市販カキ 8 ロットについてノロウイルス検査を実施した。カキ中腸腺 1g 中のウイルス量は GI が  $7.7 \times 10^1 \sim 1.7 \times 10^3$  コピー、GII が  $3.3 \times 10^2 \sim 1.7 \times 10^4$  コピーで、GII コピー数は GI コピー数の 2.0 ~ 16.3 倍であった。検出ノロウイルスの遺伝子型は GI では GI/4, 5, 6, 7, 12, 14, GII では GII/3, 4, 6, 14 であった。GII/4 が 8 ロット 13 検体、GII/6 が 4 ロット 5 検体から検出され、優勢な遺伝子型であった。

(重本研究協力報告)

広島市において、2014 年 2 月に購入した市販カキ 5 ロット 15 検体を対象に胃腸炎ウイルス (ノロウイルス、サポウイルス、アストロウイルス、A 型肝炎ウイルス、E 型肝炎ウイルス、パレコウイルス) の検出を試みた。その結果、ノロウイルスが 4

ロット 7 検体、サポウイルスとアストロウイルスがそれぞれ 2 ロット 3 検体から検出された。その他のウイルスは検出されなかった。

(山本研究協力報告)

福岡県において、2014 年 2 月に購入した市販カキ 6 ロット中 3 ロット (加熱調理用 2 ロット、生食用 1 ロット) から最大 11, 388 コピー/中腸腺 1g のノロウイルスが検出された。遺伝子型は GI/4, GI/7, GI/14, GII/3, GII/4 Sydney 2012, GII/6, GII/13 および GII/14 であった。

(吉富研究協力報告)

## (2) 下水等の食品媒介ウイルスの汚染実態調査

岩手県において、2014 年 10 月 ~ 2015 年 1 月に、県内 A 湾産から採取された養殖カキ 48 検体および同湾に隣接する下水処理施設で採取された流入水、放流水計 16 検体を対象にノロウイルス遺伝子の検出を試みた。その結果、養殖カキでは 1 月に水深 2 m に垂下したカキ 2 検体からノロウイルス GII が検出された。流入水では 10 月、12 月、1 月にノロウイルス GI および GII が検出され、放流水では 12 月にノロウイルス GI が検出された。遺伝子型は、カキからは GII が 1 種類、下水からは GI, GII がともに 2 種類検出された。カキ由来株と下水由来株の遺伝子型は異なった。

(佐藤研究協力報告)

愛知県において、2013/14 シーズンに採水された流入下水 52 検体のうち、ノロウイルスの検出を試みた。GI 陽性が 35 検体 (67.3%)、GII 陽性が 41 検体 (78.8%) で、ほぼ同じ割合で年間を通じて検出された。

(小林研究協力報告)

堺市において、A型肝炎ウイルス及び下痢症ウイルスの流行状況を解析するため、A型肝炎患者及び散発・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の両面からウイルスの分子疫学的解析を行った。下水流入水3検体(2013年12月, 2014年2, 3月)からA型肝炎ウイルス遺伝子が検出された。同時期に当該下処理場の地域ではA型肝炎患者は報告されていないが、この地域にA型肝炎ウイルス感染者が存在していたと推測された。ノロウイルスの下水中の遺伝子量は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、アイチウイルスで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、不顕性感染など顕在化しないウイルス感染が多いことが示唆された。

(三好研究協力報告書)

福岡県において終末処理場流入水中からノロウイルスGIが2月から6月、GIIが11月から7月かけて検出された。検出されたノロウイルスV量はGIと比較してGIIが約100倍多かった。

(吉富研究協力報告)

熊本県内で2014年2月に購入した生食用及び加熱調理用生カキ各1ロットおよび2014年11月に購入した加熱調理用生カキ1ロットのうち、2014年2月購入の2ロットからノロウイルスが検出された。中腸腺1g中の遺伝子量は、最小233コピー、最大41,136コピーであった。遺伝子型はGI/2, GI/4, GI/13, GI/14, GII/4

及びGII/6の6種類(生食用:2種類, 加熱調理用:5種類)であり、GII/4はSydney2012変異株であった。

(原田研究協力報告)

### (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

富山県において2014年1月～12月にウイルス性感染性胃腸炎及び食中毒等の集団発生は9事例(食中毒事例は2事例)みられ、全ての事例からノロウイルスが検出された。小児散発例からは、25例中8例からノロウイルス、5例からサポウイルスが検出された。

(滝澤研究分担報告)

東京都において、2013年4月～2014年3月に胃腸炎ウイルス検査の依頼があった444事例のうち201事例(45.3%)1,254名からノロウイルスが検出された。このうちGIは16例、GIIは167例、GIとGIIが18例であった。月別では12月が50例で最も多く、次いで1月(44例)であった。検出遺伝子型はGII/4が108例(53.5%)で最多、次いでGII/6が33例(16.4%)であった。GII/6発生例のうち、16例(48.5%)は小児施設で発生していた。また、GII.17が4月以降4事例から検出されたが、Po1領域の塩基配列を確認したところいずれもGII.P3でキメラウイルスであった。

(宗村研究協力報告書)

愛知県において2013/14シーズンに散発性感染性胃腸炎患者から採取された糞便292検体についてノロウイルスの検出検査を実施した。83検体(28.4%)からノロウイルスが検出され、GI陽性が2検体(2.4%)、GII陽性が81検体(97.6%)で

あった。遺伝子型はGIが6と11の2遺伝子型、GIIが1, 2, 3, 4, 6, 13, 14の7遺伝子型に型別され、GII/4が58.0%と過半数を占めた。GII/4はSydney 2012変異株が多くを占めた。胃腸炎集団発生15事例のうち12事例からGII/4が検出され、その全てがSydney 2012変異株であった。

(小林研究協力報告)

大阪市において2014年1月～12月にノロウイルス集団胃腸炎が107事例確認された。春季には低年齢層においてGII/6による事例が多発し、7月まで認められた。GII/6の多くは互いに近縁で、過去のGII/6株とは遺伝的に異なった。9月～12月には再び低年齢層においてGII/3株による事例が多発した。GII/4株による事例は1月～3月、12月に発生し、多くはSydney 2012変異株が関与した。また、8月および12月に発生した2事例から、本市で過去にほとんど検出されていないGII.17が検出された。

(入谷研究協力報告)

愛媛県において2013年10月～2014年9月に、散发性胃腸炎115例からノロウイルスが検出され、GIIが98.3%(113例)を占めた。GIIの遺伝子型はGII/2, 6, 4, 3, 14, 7であった。GII/6は5月～6月、GII/2は10月～12月、GII/4は1月～5月に、GII/3は2月にそれぞれ多く検出され、時期により検出遺伝子型に違いがみられた。集団発生例では、6事例からGIIが、1事例からGIとGIIが検出された。1月～7月及び12月の集団事例のGII/6検出株は同一のクラスターを形成し、11月～1月のGII/6検出株は別のクラスターを形成し2009年流行株と近縁であった。

Cap全長領域においても同様であった。

(山下研究協力報告)

熊本県において、2011年4月～2014年12月に下痢症由来サポウイルス(散发事例:39株, 集団1事例:4株)の遺伝子解析を行ったところ、散发事例株はGI.1:7株, GI.2:12株, GI.3:3株, GI.5:1株, GII.1:2株, GII.3:4株, GIV:1株及び型別不能:9株であり、集団事例株は、GII.3:3株及び型別不能:1株であった。年度別にみると、2011年度～2013年度はGIが約7割を占めたが、2014年度はGII.1およびGII.3が検出された。

(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機関を対象に精度管理を実施した結果、陰性試料については一部のデータを除いて全ての検査機関で正しい結果を報告した。これに対して陽性試料については検量線作成時のcDNA溶液の種類間で低濃度試料の換算量の平均に有意差が認められた。これらの変動については試料により程度の差はあるが、配布cDNAで検量線を作成し測定したほうが機関cDNAで測定した結果に比べすべての試料で低い傾向が認められた。また、配布cDNAは機関cDNAより濃度のばらつきが少ないことが確認された。

(渡辺研究分担報告)

## D. 考察

### 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・トラップ法の汎用化に向けた検討

食品のウイルス検査の円滑な普及に繋げるために工業用ガンマグロブリンを用いることを検討結果、工業用ガンマグロブリンは医療用と比べて同等以上の効果を有することが明らかとなった。これまで我が国では、ガンマグロブリンは医療用のものしか販売されていなかったが、本研究の実績を踏まえて、工業用のものが一般に購入できるようになった。この工業用ガンマグロブリンは、パントラ法の円滑な普及に寄与するものであると考えられる。

食品のウイルス検査において偽陽性防止対策は最も重要な課題の一つである。PCRにおいてTの代わりにUを含む系として、UNG 処理を行うことで、増幅産物のキャリーオーバーによる汚染の低減が可能となる。2<sup>nd</sup> PCR ではUNG 処理が行えないが、リアルタイム PCR の Ct 値に着目し、20 サイクル以上で増幅曲線が立ち上がるような場合は、汚染の可能性を考慮して再試験をするなど慎重に対応することで偽陽性は防止できるものと考えられる。なお、本研究で検討した偽陽性防止対策は、これまでの封じ込めを主体とした対策と合わせて実施することで効果が得られるものであることに留意しなければならない。

(斎藤研究分担報告)

## (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

患者糞便材料について直接網羅的ゲノム解析を行った結果、全体のリード数に占めるノロウイルスのリード数は数%未満と少なく、解析の際には全体のリード数を十分に確保する必要があると考えら

れた。複数のノロウイルス遺伝子型に加えサポウイルスとアイチウイルスが検出された事例は、生ガキの喫食を原因としており、カキに含まれる複数のウイルスへの暴露を反映していると考えられた。今後網羅的ゲノム解析において、検体からより多くのリード数を解読し、十分な長さのコンティグを得ることや、PCR 産物を解析すること等を検討する必要があると考えられた。

(滝澤研究分担報告書)

## (3) 食品のウイルス検査に使用する陽性コントロールの作製

食品からのウイルス検査法に関しては現在陽性コントロール等検査体制が十分には整っていない。そこで、今回、A 型肝炎ウイルス、メングウイルス、コクサッキーB5 型ウイルスについてコントロール DNA を作製した。今後、各ウイルスの検査において陽性コントロールとして利用できるように準備を進めたい。

(上間研究分担報告)

## (4) A 型肝炎ウイルスの新規リアルタイム PCR 検出系の開発に向けた検討

A 型肝炎ウイルスのリアルタイム PCR 法として、新規 nested PCR の増幅系のプライマーを用いて、サイバークリーン検出系を検討した。この方法が確立すれば一度の PCR によりリアルタイム PCR による迅速検出と分子疫学解析が同時に行え、検査の時間短縮、簡便化等が期待できる。3 ステップ PCR サイクルを用いて、伸長反応を長くすることで、リアルタイム PCR で検出が可能となった。また、3 社のサイバークリーン系検出試薬及び、タカラバイオ、ABI 社のリアルタイム PCR 装置を用



いて検討した結果、いずれにおいても同等の検出感度が確認され、汎用的に利用できることが示唆された。しかしながら、現状では陰性コントロールにも $10^2$ コピー程度の反応が検出されており、今後の検討が必要である。

(上間研究分担報告)

#### (5) カキからのノロウイルス遺伝子検出法および検出ウイルスの遺伝子型別法の検討

今回、一般食品の検査法で使用されている恒温で反応する逆転写酵素およびPCR酵素をカキからの胃腸炎ウイルスの検出検査に適用することにより、nested PCR法で非特異的な増幅の少ない検出が可能であった。しかし、リアルタイムPCR法による定量検査では、検出感度が低下し、従来の方がよいように思われた。複数のノロウイルスの遺伝子型が含まれる検体については、遺伝子型別を実施する際クローニングの手法がとられることが一般的であるが、時間と手間を要する。今回、塩基配列特異的なシークエンスプライマーを用いたダイレクトシークエンスにより、GII/4とGII/6の配列情報を得ることができた。流行中のウイルスの遺伝子型が判明している場合は、塩基配列特異的なシークエンスプライマーを用いてのシークエンスが有効と考えられる。

(田村研究協力報告)

SPIA法は試料に含まれるウイルス量が微量と推測される食品材料からのウイルス検査において有効であると考えられたが、阻害物質の影響を受けやすいため、本反応系試料に適した前処理を実施することが本反応系を有効に作用するための

必須な条件と推定された。検査試薬が高価であることに加えて、効果的な前処理方法を設定・選択することが重要である。

(森研究協力報告)

ハイドロキシアパタイトを用いたノロウイルス回収法は、清浄な試料であれば十分な回収率が得られる一方、カキの乳剤など夾雑物が多い検体ではその効果を十分に発揮できないと考えられた。このことから、拭き取り検体のような夾雑物の混入が少ない試料から微量なウイルスを回収するような試験に利用できる可能性が高く、今後このような試料への適用性を試してみる必要があると思われる。

(重本研究協力報告)

## 2. 変異株等早期検出のための食品・環境のサーベイランス

### (1) カキにおける食品媒介ウイルスの汚染実態調査

昨年に引き続きカキの各種の食品媒介ウイルス汚染実態調査を実施した。調査対象ウイルスは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型肝炎ウイルスなどとした。2014年2月に全国10か所の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 Sydney2012変異株、GII/6が検出され、ヒトでの流行を反映した(吉澄、筒井、佐藤、田村、入谷、重本、山本、吉富、原田研究協力報告)。検出遺伝子型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。その原因として、不顕性感染例の存在、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。昨年の調査に引き続き、カキからブタ型ノロウイルスが検出され、また既知の遺伝子群に属さないノロウイルスも検出された（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。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（田村，入谷，重本，山本，吉富，吉岡研究協力報告）。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。

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（田村研究協力報告）、GI.2の流行を反映しているものと考えられる。

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。しかし、後述のように下水からA型肝炎ウイルスが検出されており（三好研究協力報告）、カキがA型肝炎ウイルスに汚染されるリスクは存在しているものと考えられる。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

岩手県の下水处理施設における調査で、12月に高い頻度でノロウイルスが検出さ

れ、同地域における感染性胃腸炎の流行との関連が示唆された。放流水が流入水よりもノロウイルスの検出率が低く、下水処理工程においてウイルスがある程度除去されていることが推察された。養殖カキから検出されたGII/6は、下水からは検出されなかったことから、同湾における養殖カキのノロウイルス汚染の要因として、当該下水処理場以外の存在の可能性が示唆された。今後、カキのノロウイルス汚染対策を進めるためにも、汚染要因のより正確な把握が重要である。

（佐藤研究協力報告）

堺市における下水調査においてA型肝炎ウイルスが3検体から検出された。検出されたA型肝炎ウイルスは感染者糞便由来と推定され、下水の調査により不顕性感染を含めたウイルスの浸淫状況を把握することが可能と考えられた。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。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。

（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

東京都における2013年度～2014年度の胃腸炎ウイルスの検査依頼数は過去2年と比較して少なかった。遺伝子型別ではGII/4が最多で、次いでGII.6が多かった。GII/6検出例の約半数が小児施設での発生であったが、その理由は調査内では解明できず、検討を続けたい。

（宗村研究協力報告）

愛知県における 2013/14 シーズンの散発性感染性胃腸炎の主要な原因ノロウイルスは GII/4 Sydney 2012 変異株であった。胃腸炎集団発生事例についても GII/4 が高頻度に検出され、その全てが Sydney 2012 であった。下水検体から、GI は 11 遺伝子型、GII は 7 遺伝子型がシーズンを通じて検出された。GII については、ヒトでの流行期に合致して、下水検体からも高頻度に検出されたが、GI は散発、集発事例からの検出例数が GII に比べ小数であるのに対し、下水からは高頻度に検出された。この結果は、ノロウイルスの大人での流行や、不顕性感染などを反映しているものと考えられる。

(小林研究協力報告)

大阪市において 2014 年に認められた GII/6 株による胃腸炎事例は、主に同一または非常に近縁なウイルスが原因であり、発生施設の多くが保育園や小学校であったことから、主に低年齢層においてヒト-ヒト感染により発生したものと推測された。本株は過去に検出された GII/6 と遺伝的に異なり、カプシド領域には 4 か所の特徴的なアミノ酸置換が認められたことから抗原性の変異も示唆された。2014 年 9 月から保育園を中心に流行した GII/3 は春季に流行したウイルスとは異なっており、この流行株の遺伝子の変化が、春季に続いて 9~12 月に同じ低年齢層で大きく流行したことに関連している可能性がある。

(入谷研究協力報告)

愛媛県において 2013 年 10 月~2014 年 9 月に、急性胃腸炎から検出されたノロウイルスの遺伝子型は検出時期により遺伝

子型の分布に違いがみられた。2014 年の主流行 GII/6 株は過去に検出された株と遺伝子学的に異なる新しい変異株であり、この株の出現が感染性胃腸炎患者数増加の原因の一つと考えられた。

(山下研究協力報告)

熊本県内で発生した散発及び集団下痢症事例から検出されたサポウイルスは 2011 年度~2013 年度は GI. 1 及び GI. 2 が、2014 年度は GII. 1 及び GII. 3 が検出され、流行遺伝子型が変化した。サポウイルスは、ノロウイルスに次ぐ食中毒及び感染症の原因ウイルスとして注目されており、近年、集団事例の報告も増加していることから、今後、本ウイルスについても病原体サーベイランスを強化していくことが重要である。

(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

外部精度管理において、検量線作成時の cDNA 溶液の種類間で低濃度試料の換算量の平均が、配布 cDNA で検量線を作成し測定したほうが機関 cDNA で測定した結果に比べすべての試料で低い傾向が認められた。これは検量線作成に使用する cDNA 溶液の定量値は配布の方が機関で使用されている定量値よりも高いということが要因と推察された。また、配布 cDNA は機関 cDNA より濃度のばらつきが少ないことが確認された。今回、測定法を共通化したが、測定するまでの前処理工程が多いことや、その処理方法、試薬もさらに規定することで検査結果のばらつきが少なくなるものと思われた。

(渡辺研究分担報告)

## 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

工業用ガンマグロブリンは医療用のガンマグロブリンと同等以上の回収率を示した。検査における相互汚染防止対策として、dUTP と UNG 処理の組み合わせによる DNA 汚染の無効化と、2<sup>nd</sup> PCR にリアルタイム PCR を用いて、Ct 値で判別する方法が有効であった。

ノロウイルス陽性検体から抽出した RNA から網羅的ゲノム解析を試みたところ、ダイレクトシーケンス法で得られた遺伝子型と一致する場合と、異なる遺伝子型のリードが得られる場合があった。

A 型肝炎ウイルス、メンゴウイルス、コクサッキー B5 型ウイルスの PCR 用の陽性コントロールプラスミドを作製した。

A 型肝炎ウイルスの長鎖 DNA (約 670 塩基) を検出するサイバークリーン検出系リアルタイム PCR 法の条件を決定した。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ある。

カキからのノロウイルスや他の胃腸炎ウイルスの検出に、特異性の高い逆転写反応と PCR 増幅を行うことで、非特異的増幅が少ない検出増幅を行うことができた。

混合波形を示す検体について、配列特異的なシーケンス用プライマーを用いることで、GII/4 と GII/6 の遺伝子型を決定することができた。

SPIA 法を導入することにより検出感度

が向上するが、阻害物質の影響が大きく、適切な前処理方法の設定と選択が必要である。

ハイドロキシアパタイトによるノロウイルス回収法は、清浄検体からは高率よく回収できたが、カキ乳剤からの回収率は低かった。

### 2. 変異株等早期検出のための食品・環境のサーベイランス

#### (1) カキにおける食品媒介ウイルスの汚染実態調査

2014 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。汚染量は GII が高い傾向にあった。2013/14 シーズンに流行した GII/4Sydney2012, GII/6 が多く検出された。それ以外にも多くの遺伝子型のノロウイルスが検出され、その一部にはヒトからの検出が少ないものやみられないもの、ブタ型のノロウイルス、群別不明のノロウイルスも含まれていた。サポウイルスは GI.2 等が検出された。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。

養殖カキでノロウイルスが検出されたものはいずれも水深 2 m に垂下したものであった。

#### (2) 下水等の食品媒介ウイルスの汚染実態調査

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