

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出法に関する研究」

研究協力報告

市販カキのノロウイルス等汚染実態調査

研究協力者	筒井 理華	青森県環境保健センター
研究分担者	野田 衛	国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

市販カキの汚染実態を明らかにするために、2014 年 2 月に購入した市販生カキからノロウイルス (NoV)、サポウイルス (SaV)、A 型肝炎ウイルス (HAV) の検出を行った。カキ 15 検体から NoV、SaV および HAV は検出されなかった。

昨年度実施した 2013 年 2 月に購入した市販生カキの調査では、加熱用、生食用に関わらず NoV が検出され、約半数の検体では GI と GII が同一検体から検出された。SaV は生食用カキから NoV GI および GII とともに検出された。このことから、カキ喫食による集団事例患者から NoV GI と NoV GII 等が同時に検出される事例が発生する可能性があることが示唆された。

また、全国的に流行していたと考えられる NoV 等がカキから検出されていたことから、ヒトで流行しているウイルスとカキに蓄積されるウイルスに関連があることが示唆された。

A. 研究目的

2012/13 シーズンに流行したノロウイルス (NoV) は、2012 年に新たに出現した NoV GII.4 変異株が主流であった。2013/14 シーズンでは GII.4 変異株の他に GII.6 が多く検出されている。NoV の流行状況を把握することは、NoV 関連胃腸炎事例の予防対策として重要である。カキは NoV 食中毒の主な原因食品として知られているが、中腸腺には NoV 以外の腸管系ウイルスも蓄積していることが知られている。そこで NoV に加え、サポウイルス (SaV)、A 型肝炎ウイルス (HAV) の市販生カキの汚染実態を明らかにするこ

とを目的として調査を実施した。

B. 研究方法

1. 材料

2014 年 2 月に青森県内で購入した国産の市販生カキ 5 ロットを用いた。購入した生カキは、生食用が 3 県 3 海域 4 ロット、加熱調理用が 1 県 1 海域 1 ロットであった。

2. 方法

カキの中腸腺 2.5~3.0g を 1 検体とし、1 ロットにつき 3 検体を調査対象とした。

それらを「食品のウイルス標準意見法検討委員会」による「一般的な食品検体

からのウイルスの回収・濃縮法」に基づき実施した。10%乳剤をアミラーゼ処理後、黄色ブドウ球菌加工試薬による濃縮を行った。濃縮沈渣に QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) および TRIzol®-LS (invitrogen) を添加し、懸濁後、RNA 抽出した。DNase 処理から逆転写反応は「ノロウイルスの検出法 (食安監発第 1105001 号)」に準じた方法で実施した。NoV は、通知法 (平成 19 年 5 月 14 日食安監発第 0514004 号厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知) に基づき、Real-time PCR 法によりウイルス遺伝子の定量を行った。Real-time PCR 法により NoV が検出された場合、RT-PCR 法によるウイルス遺伝子検出を行い、DNA ダイレクトシーケンス法にて塩基配列を決定し、系統樹解析を行った。SaV は Kitajima らの方法 (Kitajima, Appl Environ Microbiol, 76, 2010)、HAV は野田ら (平成 23 年度分担報告書改良法) に基づき RT-PCR 法によるウイルス遺伝子検出を行い、SaV、HAV 陽性株は、NoV と同様に DNA 遺伝子解析を行った。

(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. 結果

市販生カキ 15 検体から NoV、SaV および HAV は検出されなかった (表 1)。

D. 考察

今回の調査では、NoV、SaV および HAV

は検出されなかったが、2013 年 2 月に購入した市販生カキを対象として昨年度の調査結果では、加熱用、生食用に関わらず NoV が検出され、約半数の検体では GI と GII が同一検体から検出され、SaV は生食用カキから NoV GI および GII とともに検出されている (表 2)。このことから、カキ喫食による集団事例患者から NoV GI と NoV GII 等が同時に検出される事例が発生する可能性があることが示唆された。

また、全国的に流行していたと考えられる NoV 等がカキから検出されていたことから、ヒトで流行しているウイルスとカキに蓄積されるウイルスに関連があることが示唆された。市販生カキの遺伝子解析を実施することにより、NoV 等食中毒原因ウイルスを推測することができることが示唆された。

2013 年および 2014 年の調査から同一海域で採取されたカキのウイルス汚染が異なっていたことから、海域差はないことが示唆された。

E. 結論

市販生カキ 15 検体から NoV、SaV および HAV は検出されなかった。昨年度の調査結果から、加熱用、生食用に関わらず NoV が検出され、約半数は GI と GII が同時に検出され、カキ喫食による集団事例患者から NoV GI と NoV GII 等が同時に検出される事例が発生する可能性があることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし
2. 学会発表
なし

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

表1. 市販生カキのウイルス検出状況 (2014)

区分	ロット	養殖地 (県-海域)	加工年月日	検体No	NoV		SaV	HAV
					GI	GII		
生食用	①	B-5	未記入	1	—	—	—	—
				2	—	—	—	—
				3	—	—	—	—
加熱用	②	B-2	2014年2月8日	1	—	—	—	—
				2	—	—	—	—
				3	—	—	—	—
生食用	③	B-5	2014年2月8日	1	—	—	—	—
				2	—	—	—	—
				3	—	—	—	—
	④	A-10	2014年2月8日	1	—	—	—	—
				2	—	—	—	—
				3	—	—	—	—
	⑤	D-99	2014年2月8日	1	—	—	—	—
				2	—	—	—	—
				3	—	—	—	—

※陰性:—

表2. 市販生カキのウイルス検出状況 (2013)

区分	ロット	養殖地 (県-海域)	加工年月日	検体No	NoV		SaV	HAV
					GI	GII		
加熱用	①	B-2	2013年2月21日	1	—	GII/14	—	—
				2	—	GII/14	—	—
				3	GI/14	GII/14	—	—
生食用	②	B-2	2013年2月22日	1	GI/7	GII/4_2012	—	—
				2	GI/7	—	—	—
				3	—	GII/13	—	—
	③	A-11	2013年2月22日	1	GI/14	GII/11	—	—
				2	GI/1	GII/4	GI	—
				3	—	GII/11	—	—
	④	A-10	2013年2月22日	1	—	—	—	—
				2	—	GII/11	—	—
				3	GI/11	GII/12	—	—
加熱用	⑤	D-99	2013年2月24日	1	—	—	—	—
				2	—	—	—	—
				3	—	—	—	—

※1 陰性:—

※2 従来の遺伝子型表記

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出法に関する研究」

研究協力報告

養殖カキおよび下水からのノロウイルス検出

研究協力者	佐藤 直人	岩手県環境保健研究センター
研究分担者	野田 衛	国立医薬品食品衛生研究所
研究協力者	高橋 雅輝	岩手県環境保健研究センター
研究協力者	齋藤 幸一	岩手県環境保健研究センター

研究要旨

2014 年 10 月から 2015 年 1 月に、岩手県内 A 湾産の養殖カキ 48 件および同湾に隣接する下水処理施設で採取した流入水・放流水計 16 件を対象に、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 件からノロウイルス 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。カキからは GII が 1 種類の遺伝子型、下水からは GI、GII ともに 2 種類の遺伝子型のノロウイルスが検出されたが、カキ由来のノロウイルスの遺伝子型は、下水由来のそれと一致しなかった。

A. 研究目的

岩手県は生食用カキの主産地であり、ノロウイルス汚染のないカキの生産は、ノロウイルスによる食中毒の発生防止を図る上で重要である。

そこで今回、安全・安心な生食用カキの生産体制の構築に資することを目的に、県内 A 湾で養殖したカキのノロウイルス汚染状況および同湾に併設されている下水処理施設の流入水・放流水に含まれるノロウイルス遺伝子を経時的に調査し、環境水におけるノロウイルスの挙動とカキへのノロウイルスの蓄積状況との関連性を検討した。

B. 研究方法

1. 材料

1) 養殖カキ

2014 年 10 月～2015 年 1 月の間、県内 A 湾のカキ養殖海域の 1 地点に、水深 2 m および 10 m の位置に垂下したカキを対象とした。調査は毎月 2 回、各水深に垂下したカキをそれぞれ 3 個ずつ採取し、計 48 件を試験に供した。

2) 下水処理施設の流入水・放流水

2014 年 10 月～2015 年 1 月の間、県内 A 湾に隣接する下水処理施設(対象人口: 8,000 人、処理方法: 長時間エアレーション法)の流入水および放流水を毎月 2 回採取し、各 8 件、計 16 件を試験に供した。

2. 試料前処理方法

1) カキの前処理は、当研究班の示す「二枚貝（カキ）からのウイルスの濃縮法」に準じて実施した。

2) 環境水は 12,000rpm で 20 分間遠心後、上清を pH3.5 に調整、陰電荷フィルターでろ過した後フィルターを細切し、3% Beef extract に誘出させたものを濃縮検体とした。

3. ウイルス検出方法

カキおよび下水から得られた濃縮材料は、当研究班の示す「濃縮材料からのウイルス RNA の抽出・DNase 処理・逆転写反応」に準じて逆転写反応まで実施した。ノロウイルス遺伝子の検出は、平成 19 年 5 月 14 日付け食安監発第 0514004 号厚生労働省通知に示すプライマーセットを用い Nested PCR を行った。

Nested PCR 反応で得られた増幅産物は、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定した。

(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. カキからの検出および遺伝子型別

養殖カキ 48 件中 2 件からノロウイルス GII が検出された (表 1)。2 件はいずれも 1 月 19 日に水深 2 m に垂下したカキであった。

ダイレクトシーケンスの結果、2 株の遺伝子型はいずれも GII/6 であった。

2. 下水からの検出および遺伝子型別

流入水 8 件中 5 件からノロウイルス GI

および GII が、放流水 8 件中 1 件からノロウイルス GI がそれぞれ検出された (表 2)。月別では、流入水で 10 月、12 月、1 月、放流水で 12 月に検出された。

流入水由来で、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定した 5 株の遺伝子型は、GII/4 2012 変異株 (2 株)、GI/2、GI/3、GII.17 (新統一命名法による) (各 1 株)、放流水由来では GI/3 (1 株) であった。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。

D. 考察

今回、養殖カキの調査を実施したところ、1 月に水深 2m の浅い地点から採取したカキにおいてノロウイルス汚染が認められた。このことは昨年の調査結果と同様の傾向を示しており、同湾における汚染実態を反映していると考えられる。しかし検体数が少ないことから、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と考える。

流入水および放流水における検出状況では、12 月に高い頻度でノロウイルスが検出された。同地域における感染性胃腸炎の流行が、同時期に増加していたことから、流行期との関連が示唆された。また放流水が流入水よりもノロウイルスの検出頻度が低く、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。

今回の遺伝子型別の結果から、カキから GII/6、下水から 4 種類の遺伝子型が検出された。このことは、同地域においてそれら遺伝子型の流行あるいは不顕性感

染があったものと推察された。一方、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、カキのノロウイルス汚染と下水との関連性を示す成績は得られなかった。このことから、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要因が存在する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と考える。

E. 結論

1. 養殖カキ 48 件中 2 件からノロウイルスが検出された。いずれも水深 2 m に垂下し 1 月に回収したものであった。
2. 下水 16 件中 5 件からノロウイルスが検出され、特に 12 月に多く検出された。

3. カキから検出されたノロウイルスの遺伝子型は、下水から検出されそれと一致しなかったことから、当該下水処理場以外の汚染要因が存在する可能性が示唆された。

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 養殖カキからのノロウイルス検出状況

採取年月日	垂下した水深	
	2 m	10 m
2014. 10. 6	-	-
10. 20	-	-
11. 4	-	-
11. 17	-	-
12. 1	-	-
12. 15	-	-
2015. 1. 5	-	-
1. 19	2/3 (2株ともGII/6)	-

--:3検体すべて陰性

表2 下水からのノロウイルス検出状況

採取年月日	下水	
	流入水	放流水
2014. 10. 6	GII/4_2012	-
10. 20	-	-
11. 4	-	-
11. 17	-	-
12. 1	GI/3	GI/3
12. 15	GI/2 GII.17	-
2015. 1. 5	-	-
1. 19	GII/4_2012	-

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出法に関する研究」

研究協力報告

市販カキからのノロウイルス等の検出状況

研究協力者	佐藤 直人	岩手県環境保健研究センター
研究分担者	野田 衛	国立医薬品食品衛生研究所
研究協力者	高橋 雅輝	岩手県環境保健研究センター
研究協力者	齋藤 幸一	岩手県環境保健研究センター

研究要旨

カキのウイルス汚染状況の把握を目的として、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、食品媒介性ウイルスの検索を行った。その結果、ノロウイルスは 5 ロット 12 検体から検出された。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、検体別では生食用で 15.4% (4/26)、加熱用で 40.9% (9/22) で、加熱用が生食用より高い傾向がみられた。遺伝子型別ではノロウイルス GII/4 が 78% (7/9) と最も多く、いずれも 2012 変異株であった。

A. 研究目的

二枚貝は、ノロウイルスによる汚染が多い食品であることが知られている。その中でもカキは、生あるいは加熱不十分による喫食により食中毒の原因となることが多い。また、カキはノロウイルス以外の食品媒介性ウイルスによる汚染も知られており、その状況を把握しておくことは、対策を検討する上で重要である。そこで今回、カキのウイルス汚染状況の把握を目的として、市販されている生食用および加熱用カキを対象に、食品媒介性ウイルスの検索を行った。

B. 研究方法

1. 材料

2014 年 2 月に購入した国産の市販カキ 7 ロット 48 検体 (生食用が 4 ロット 26 検体、加熱用が 3 ロット 22 検体) を対象とした。中腸腺 1.5 ~ 2.0 g を 1 検体とし、各ロットに含まれるすべてのカキを検査に用いた。

2. 検索ウイルスおよび検査方法

検索ウイルスは、ノロウイルス、サポウイルス、A 型肝炎ウイルス、E 型肝炎ウイルスとした。

検査方法は、カキの前処理は当研究班の示す「二枚貝(カキ)からのウイルスの濃縮法方法」に準じて実施した。得られた濃縮材料は、当研究班の示す「濃縮材料からのウイルス RNA の抽出・DNase 処理・逆転写反応」に準じて逆転写反応

まで実施した。遺伝子検出は Nested PCR 法により、ノロウイルスは平成 19 年 5 月 14 日付け食安監発第 0514004 号厚生労働省通知、サポウイルスは Kitajima ら (Appl Environ Microbiol, 76:2010) の報告、A 型肝炎ウイルスは野田ら (厚生労働科学研究「食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究」平成 23 年度総括・研究分担報告書) の報告、E 型肝炎ウイルスは国立感染症研究所の示す「E 型肝炎検査マニュアル」に準じて、それぞれ実施した。

Nested PCR 反応で得られた増幅産物は、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定した。

(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. 検索ウイルスの検出状況

市販カキ 7 ロット 48 検体のウイルスを検索した結果、ノロウイルスは 5 ロット 12 検体から検出された (表)。サポウイルス、A 型肝炎ウイルス、E 型肝炎ウイルスは、全て陰性だった。

2. ノロウイルスの検出

ノロウイルスは、ロット別で生食用 4 ロット中 3 ロット (75.0%)、加熱用 3 ロット中 2 ロット (66.7%)、検体別では生食用 26 検体中 4 検体 (15.4%)、加熱用 22 検体中 9 検体 (40.9%) から検出された (表)。

3. ノロウイルスの遺伝子型

ノロウイルス陽性となった 13 検体につ

いてダイレクトシーケンスを実施した結果、9 株のノロウイルスが遺伝子型別された。GII/4 が 7 株 (78%) と大半を占め、GI/4 および GII/14 が各 1 株 (11%) であった (表)。GII/4 はいずれも 2012 変異株であった。

D. 考察

市販カキ 7 ロット 48 検体中 5 ロット 12 検体からノロウイルスが検出された。ノロウイルスが高率に検出された要因として、今回調査したカキが感染性胃腸炎の流行期に採取されたものであることによると推察される。今後、異なる時期のカキを調査することで、より正確な汚染状況が明らかになると考えられる。

一方、ノロウイルス以外の食品媒介性ウイルスについて検出されなかったことから、この時期におけるカキの汚染率は低いと推察されたが、検体数が少ないこともあり、今後も調査を継続する必要がある。

ノロウイルスの検出率は、検体別で生食用よりも加熱用でやや高い傾向がみられた。このことから、この時期の加熱用カキを喫食する場合は、十分に加熱する必要があると消費者に注意喚起することが重要である。また、生食用カキからもノロウイルスが検出されていることから、この時期に採取されたカキの生食は控えることが望ましいと考える。

ノロウイルスの遺伝子型は、GII/4 2012 変異株が最も多く検出された。このことは 2013/14 シーズンに同株が広く流行したことによるものと推察される。一方、GI/4 および GII/14 も検出されたことから、これらの小流行あるいは不顕性感染

の存在が示唆された。

E. 結論

2014年2月に採取した市販カキを対象に食品媒介性ウイルスの検索を行い、以下の結果を得た。

1. 市販カキ7ロット中5ロットからノロウイルスが検出された。
2. ノロウイルスの検出率は、検体別で生食用よりも加熱用でやや高い傾向がみられた。
3. ノロウイルスの遺伝子型は、GII/4 2012変異株が最も多く検出された。

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 市販カキからの食品媒介性ウイルス検出結果

区分	ロット数(No)	海域	サンプルNo	NoV GI	NoV GII	SaV	HAV	HEV
総計	7	5	48	5	8	-	-	-
生食計	4	4	26	2	2	-	-	-
加熱計	3	3	22	3	6	-	-	-
生食	O-1	9	1	-	-	-	-	-
			2	-	-	-	-	-
			3	-	-	-	-	-
			4	-	GII/4 2012変異株	-	-	-
			5	-	-	-	-	-
			6	-	-	-	-	-
生食	O-2	4	1	-	-	-	-	-
			2	-	-	-	-	-
			3	-	-	-	-	-
			4	-	-	-	-	-
			5	-	-	-	-	-
			6	-	-	-	-	-
			7	-	-	-	-	-
			8	-	-	-	-	-
生食	O-3	5	1	-	-	-	-	-
			2	-	-	-	-	-
			3	GI_mixed	-	-	-	-
			4	-	-	-	-	-
			5	-	-	-	-	-
生食	O-4	4	1	-	-	-	-	-
			2	-	-	-	-	-
			3	-	-	-	-	-
			4	-	-	-	-	-
			5	GI_mixed	-	-	-	-
			6	-	GII/4 2012変異株	-	-	-
			7	-	-	-	-	-
加熱	O-5	9	1	-	-	-	-	-
			2	-	-	-	-	-
			3	-	-	-	-	-
			4	-	-	-	-	-
			5	-	-	-	-	-
			6	-	-	-	-	-
			7	-	-	-	-	-
加熱	O-6	2	1	-	-	-	-	-
			2	-	GII/4 2012変異株	-	-	-
			3	GI/4	-	-	-	
			4	-	-	-	-	
			5	-	-	-	-	
			6	-	-	-	-	
加熱	O-7	7	1	GI_mixed	GII/4 2012変異株	-	-	-
			2	GI_mixed	-	-	-	
			3	-	GII/4 2012変異株	-	-	
			4	-	GII/14	-	-	
			5	-	GII/4 2012変異株	-	-	
			6	-	GII/4 2012変異株	-	-	
			7	-	-	-	-	
			8	-	-	-	-	
			9	-	-	-	-	

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出法に関する研究」

研究分担報告

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

研究協力者	植木 洋	宮城県保健環境センター
研究協力者	木村 俊介	宮城県保健環境センター
研究分担者	野田 衛	国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

平成 23 年 11 月から平成 26 年 12 月までに買い上げた市販生食用カキ 765 件を対象として、通知法の定量 PCR 法によるノロウイルス (NoV) 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) を満たす検体は確認されなかったが、10 コピー未満で増幅曲線が認められた検体が 176 件あり、Nested-Realtime PCR を行った結果、38 件 (21.6%) が遺伝子増幅に伴う蛍光の増加を示し陽性検体と判断された。

A. 研究目的

カキを対象としたノロウイルス (NoV) の定量 PCR 法による検査 (食安監発第 1105001 号, 以下通知法) においては、実測値が陽性基準 (2 ウェル中 2 ウェル共に 10 コピー以上) を満たさなくとも増幅曲線が確認されるケースがある。そこで、通知法における陽性基準の科学的妥当性を評価するために、検証を行った。

材料について、通知法に基づいた定量 PCR 法で NoV 遺伝子検出検査を実施した。そのうち、実測値が陽性基準を満たしていないが増幅曲線が確認された検体の cDNA について、カプシド領域のプライマーを用いた Nested-Realtime PCR 法を実施した。

(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

平成 23 年 11 月から平成 26 年 12 月までに県内で買い上げた市販生食用カキ計 765 件を検査対象とした。

2. 方法

C. 研究結果

市販生食用カキ 765 件について、定量 PCR 法で NoV 遺伝子検出検査を実施した結果、通知法の陽性基準を満たす検体は確認されなかった。しかし、増幅曲線が

確認された検体が 176 件あった。それらについて Nested-Realtime PCR 法を実施した結果、38 件 (21.6%) で NoV 遺伝子の増幅に伴う蛍光の増加が認められ陽性検体と判断された (図 1)。Nested-Realtime PCR 法で陽性及び陰性であった検体の定量 PCR 法での平均実測値は各々 1.1 コピーと 0.9 コピーであったが、有意な差は認められなかった (図 2)。

D. 考察

定量 PCR 法の陽性基準は満たしてはいないが、増幅曲線が確認されたカキ検体 176 件中 38 件 (21.6%) から Nested-Realtime PCR 法によって NoV 遺伝子が検出された。このことから、実測値 10 コピー未満の検体でも増幅曲線が確認された場合には、Nested PCR 法、または、Nested-Realtime PCR 法など 2 段階で遺伝子を増幅する方法による検査の必要性が認められた。特に食中毒事例での食材や拭き取りの検査では、定量 PCR 法で 10 コピーを超える検体は多くなく、陰性と判断されるケースがある。しかし、このような場合においても 2 段階で遺伝子を増幅することにより、精度の高い検査が可能となり、原因推定食品が不明の事例が多い NoV による食中毒事例の原因解明には有効と考えられる。

E. 結論

通知法である NoV 遺伝子の定量 PCR 法の陽性基準を適用した場合、本来陽性である検体が陰性として扱われる可能性が

危惧される。一般に検出される NoV 遺伝子数が低いと類推される検体を対象とした検査では、陽性基準値である 10 コピー未満の検体であっても、増幅曲線が認められる場合には、Nested PCR 法や Nested-Realtime PCR 法による再検査が必要である。

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

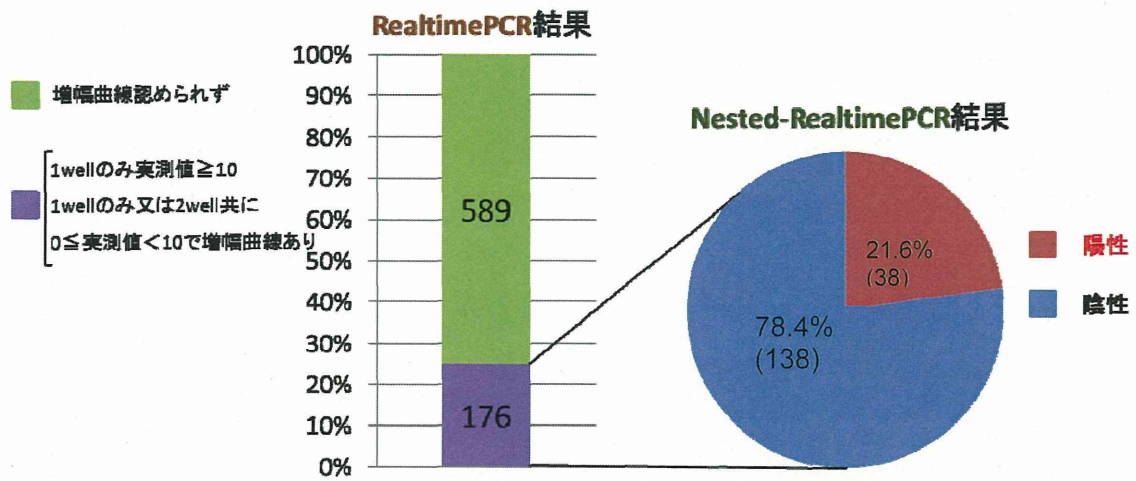


図1. 定量PCRとNested-Realtime PCRの結果

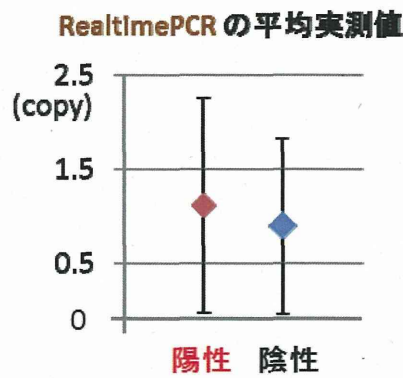


図2. Nested PCR 陽性検体と陰性検体の定量PCR (Realtime PCR) 検査での実測値

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出法に関する研究」

研究分担報告

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

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	野田 衛	国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

カキからのウイルスの検出には、カキの細胞由来の多量の RNA が対象ウイルスの特異的な検出を阻害したり、非特異増幅が起こることが多い。そこで、以下の二つの方法でウイルス遺伝子の増幅と塩基配列の取得を行った。

①一般食品からのノロウイルスの検出に使用される、配列特異プライマー、及びサポウイルス、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を実施し、更に特異性の高い酵素を使用して遺伝子増幅した。

②ダイレクトシーケンス法で GII の型の混合した Electropherogram を示すサンプルから、シーケンス用プライマーを設計して GII/4 Sydney 2012 と GII/6 ノロウイルスの遺伝子を検出した。

これらの方法を用いて、2014 年 2 月に市販されていた生食用カキ 3 ロット、加熱加工用カキ 3 ロットの生カキを購入し、1 ロットあたり 3 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、アイチウイルスの検索を実施した。GI ノロウイルスは 3 ロット 4 検体から、GII ノロウイルスは 6 ロット 14 検体から検出された。GII ノロウイルスのうち 5 ロット 11 検体で GII/4 2012 Sydney 変異株の存在が確認でき、GII/6 は 5 ロット 9 検体で確認できた。サポウイルスは、2 ロット 2 検体から GI-2 が、アストロウイルスは 4 ロット 9 検体から、アイチウイルスは 4 ロット 7 検体から検出された。今回調査したカキは、多くの胃腸炎ウイルスによって汚染されていることが確認された。

A. 研究目的

カキはノロウイルス等のウイルスを中腸腺に濃縮することから、それを生で食べたり、加熱不十分で喫食したりすることで食中毒が起こることが知られている。

カキからのノロウイルスの検出では、ランダムプライマーを使用して逆転写した場合は、PCR 反応で非特異的な増幅が認められる場合も多く、反応条件の検討が必要となったり、ダイレクトシーケンス

による遺伝子型の把握が困難となる場合も多い。

そこで、非特異増幅を抑制する方法として、一般食品中のノロウイルスの検査法で使用されている逆転写反応や PCR 反応の応用を試みた。

さらに、カキ由来のノロウイルス遺伝子の増幅産物には多くの遺伝子型のノロウイルスが混在しており、これらは通常クローニングを行って含まれる遺伝子型が調べられている。クローニングには時間と手間がかかることから、遺伝子型に特異的な配列をもつシークエンス用プライマーを作製して、ダイレクトシークエンスで塩基配列データを得る方法を検討した。

これらの検討を行とともに 2014 年 2 月に採取された市販生カキのノロウイルス汚染状況を調べた。

B. 研究方法

1. 材料

生カキ：新潟県内のスーパー等で、2014 年 2 月に購入した生食用 A 県産 2 ロット、加熱加工用 B 県産 2 ロット、C 県産 2 ロット合計 6 ロットを材料とした。

2. カキからのノロウイルス遺伝子の抽出方法

中腸腺 1 個から 2 個を 1 検体として、1 ロットあたり 3 検体検索した。中腸腺の総量は 2.3g から 4.2g の範囲となった。10 倍量の PBS(-)を加えてストマッカーにかけ、これをアミラーゼ処理 PEG 濃縮法によってノロウイルスを濃縮し、High Pure Viral RNA Kit (Roche) により核酸を抽出した。DNase 処理はオンカラム処理法

により実施した。最終的に、50 μ l の抽出産物を得た。

3. 抽出核酸の逆転写

ウイルス遺伝子の特異的増幅と遺伝子解析のため、抽出 RNA の逆転写には特異性の高い Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) (以下、Transcriptor RT) を用いた。

ノロウイルスは食品からのノロウイルスの検出法に記載の PANR-G1, PANR-G2 をプライマーとして 58°C30 分、85°C5 分の反応条件とした。

この対照として、ランダムプライマーと Oligo dt が含まれる High capacity RNA-to-cDNA Kit (Life technologies) (以下、High capa RT) を用いて、37°C1 時間、95°C5 分で逆転写反応を実施した。

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は、表 1 の 1st PCR のリバープライマーと Transcriptor RT を使用して、プライマーのアニーリング温度に併せて、50°C30 分、85°C5 分の反応条件で実施した。

4. コンベンショナル PCR によるノロウイルスの検出

ノロウイルスのコンベンショナル PCR 用のプライマーには、GI は 1st PCR に COG1F/G1SKR を使用し 2nd PCR に G1SKF/G1SKR、GII は 1st PCR に COG2F/G2SKR を使用し 2nd PCR に G2SKF/G2SKR を使用した。

また、特異的な増幅を行うため、1st PCR の試薬に AptaTaq Fast PCR Master (Roche) を使用して、タッチダウン PCR とし、95°C1 分、5 サイクルの 95°C30 秒、55°C \rightarrow 50°C (1 サイクル各 1°C の減少) 1

分、72°C1 分の後、40 サイクルの 95°C30 秒、50°C30 秒、72°C30 秒の反応後、72°C 7 分の反応を実施した。

2nd PCR 反応には、Takara Ex Taq (Takara) を使用して、95°C2 分の後、30 サイクルの 95°C30 秒、50°C30 秒、72°C30 秒の反応後、72°C7 分の反応を実施した。

5. 遺伝子解析

遺伝子データは、PCR 産物を Agencourt AMPure XP (Beckman coulter) により精製後、Big Dye Terminator V3.1 と PCR 用プライマーによりサイクルシーケンス反応を実施し、後精製は Agencourt CleanSEQ (Beckman coulter) により実施し、ABI3130 遺伝子解析装置 (ABI) により取得した。

得られたデータは、MEGA5.02 により解析と系統樹作成を行った。

6. シークエンス用プライマーによるノロウイルス遺伝子型の混合検体からのダイレクトシーケンス

2013-14 シーズンには、GII/4 と GII/6 の遺伝子型のノロウイルスの流行が確認されており、これらの型がカキに含まれている可能性が高いことから、以下の 4 つのシーケンス用プライマーを 2nd PCR プライマーの G2SKF と G2SKR の内側に設定した。これらを用いて、G2SKF と G2SKR によるダイレクトシーケンス法による解析では Electropherogram が混合波形となったサンプルのシーケンス採取を実施した。

G2-4 F seq : TCG CAA TCT GGC TCC CAG TTT T、G2-4 R seq : TAA CCA TTG TAC ATT

CTG GCC AAA、G2-6 F seq : TCG CAA TCT TGC TCC CGA GG、G2-6 R seq : CCC ATT ATA CAT ACG GGA CAG G

7. カキに含まれるノロウイルスの TaqMan リアルタイム PCR 法による定量と逆転写反応の違いによる比較

カキに含まれるノロウイルスの定量は、「平成 15 年 11 月 5 日付け食安監発第 1105001 号」通知中のリアルタイム PCR 法で実施した。この試薬には TaqMan Universal PCR Master Mix (ABI) を使用した。なお、cDNA 量は 2.5 μ l とし、試薬を含む総量は 25 μ l の系で実施した。

逆転写効率は、ノロウイルスの定量値に大きく影響するため、High capa RT と Transcriptor RT の二つの逆転写方法によるノロウイルスの定量値の比較を行った。

(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. ノロウイルスのコンベンショナル PCR 法による検出状況

コンベンショナル 2nd PCR 法では、Transcriptor RT を用いた 58°C の高温による逆転写のためか、GI 及び GII ノロウイルスとも、電気泳動結果は非特異バンドの無い良好な結果となった。

検出状況では、GI ノロウイルスが、生食用のカキ 2 ロット中 1 ロット 3 検体から、加熱調理用のカキ 1 ロット中 1 検体から検出された。遺伝子型は、GI/4、GI/2、

GI/14であった(表3、図2)。

GII ノロウイルスは、生食用のカキ3ロットの5検体、及び加熱調理用のカキ3ロットの9検体から検出された。検出された遺伝子型は、4検体以外はElectropherogramの波形が混合していて塩基配列を判別できなかった。

しかし、GII/4とGII/6をターゲットにしたシークエンス用プライマーを用いることで、波形が混合していた10検体のうち、GII/4 Sydney 2012が9検体から、GII/6が7検体から、GII/13が1検体から確認できた。しかし、シークエンスプライマーを用いた遺伝子解析においても、Electropherogramの波形が混合し、データが採取できない検体もあった。

また、GII/6のシークエンス用リバースプライマーとして作製したG2-6Rで採取したElectropherogramでは、ノイズが多かったことからこのプライマーは設計の変更が必要と考えられた(表3の▼印のサンプル)。

2. ノロウイルスの定量試験結果

ノロウイルスGIの定量では、3ロット4検体で増幅がみられたが、いずれも実測コピー数が定量下限の10コピーを下回ったことから全て陰性と判定された。

ノロウイルスGIIの定量では、6ロット15検体で増幅がみられたが、実測コピー数が定量下限の10コピーを下回った検体が5検体あったことから、この5検体は陰性と判定され、陽性検体は5ロット10検体となった。生食用のHGの産地の1ロットは、定量PCRではGI、GIIノロウイルスとも陰性の判定となった。一方、加

熱用のN産地のカキの陽性率が2ロットとも3/3と高く、中腸腺1gあたりのコピー数も高かった。

生食用カキのほうが、加熱用のロットのよりGIIノロウイルスの定量値は低かった。

同一の抽出サンプルをTranscriptor RTとHigh capa RTでcDNAを合成し、両者の間で定量値を比較してみた(表4)。

Transcriptor RTで合成したcDNAのほうがHigh capa RTよりGI、GIIともコピー数が低い値となり、Transcriptor RTでは陽性判定の検体は無かった。一方、High capa RTでは、GIIノロウイルスの定量で陽性判定となったものは10検体あった。

High capa RTのcDNAを用いたリアルタイムPCR法による定量で陽性となったサンプルと、Transcriptor RTのcDNAを用いたコンベンショナル2nd PCRで陽性になった検体を比較した。リアルタイムPCR法では、GIIが陽性となった検体は10検体であったが、コンベンショナルPCR法で陽性となった検体は14検体あった。また、両者ともに陽性となったサンプルは7検体であった。

3. サポウイルス、アストロウイルス、アイチウイルスの検出状況(表3、図2)

サポウイルスは生食用の1ロット1検体及び加熱用の1ロット1検体から検出され、遺伝子型はいずれもGI.2であった。

アストロウイルスは、生食用の1ロット1検体から、加熱用の3ロット8検体から検出され、加熱用のカキの汚染が高い傾向があり、いずれも血清型は1型で

あった。

アイチウイルスは、生食用の1ロット3検体、加熱用の3ロット4検体から検出され、全てA型であった。更に1ロット1検体から Canine Kobuvirus に近縁な株を検出した。

D. 考察

カキからの抽出サンプルには、カキの細胞中のRNAが含まれており、PCR反応による少量のウイルスの検出を阻害することが経験される。特に、ランダムプライマーを使用したRTサンプルのPCRでは、非特異バンドが出たり、対象遺伝子が微量な場合は検出できなかつたりすることが経験され、PCR反応の条件の再設定が必要となつたりする。

今回、コンベンショナルPCR法による胃腸炎ウイルスの検出には、特異性を高めるため、配列特異プライマーとTranscriptor RTを使用して高温での逆転写反応に加えApta Taqを使用して1st PCR反応における非特異反応を抑制して特異性の高い反応を行ったことにより、2nd PCRにおいても非特異バンドが無い増幅が可能であった。

しかし、Transcriptor RTとHigh Capa RTを比較すると定量では前者の増幅が弱く、後者の増幅率が良かった。配列特異プライマーの使用とランダムプライマーの使用の差異も考えられるが、特異性の高いコンベンショナルPCRには配列特異プライマーとTranscriptor RTが向いており、定量にはランダムプライマーとHigh Capa RTが向いていると思われた。

遺伝子型が混合したサンプルについて

は、クローニングの手法がとられることが通常である。しかし、クローニングは、プラスミドへの挿入やベクターとなる細菌の増殖作業が必要で、更に一定数のコロニーから遺伝子塩基配列を採取する必要があり、時間と手間を要する。

今回は、塩基配列特異的なシーケンスプライマーを作製してダイレクトシーケンスにより、GII/4とGII/6の配列情報を得ることができた。流行しているノロ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ケンスプライマーを作製してデータを採取することも可能と考えられる。

コンベンショナルPCR法とリアルタイムPCR法で、陽性判定結果が異なることから、対象となる遺伝子の量が微量のサンプルの場合には、試薬やプライマーの選択による影響が大きいと考えられた。

2013-14シーズンは、ノロウイルスGII/4 Sydney 2012とGII/6ノロウイルスが流行したが、これと同じ型のノロウイルスが生カキから検出された。

このほか、多様な型のGIノロウイルスやサポウイルスに加え、アストロウイルス、アイチウイルスも検出されたことから、これらのノロウイルスもヒト集団中に感染していたことが推測された。

E. 結論

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、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。特異性の高い逆転写と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。