

201522012A

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27年度 総括・研究分担報告書

研究代表者 野田 衛

平成28(2016)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 27 年度 総括・研究分担報告書

研究代表者 野田 衛

平成 28 (2016) 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. サポウイルスに対してパンソルビン・トラップ法を用いる際の RNA 検出系の最適化

齋藤 博之 他 ----- 23

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

滝澤 剛則 他 ----- 39

3. ウイルスの食品検査の精度管理

鈴木 達也 他 ----- 49

4. 食品からのウイルス遺伝子検出法で用いられる標準 DNA のデジタル PCR によるばらつきの検討

上間 匡 ----- 75

5. 次世代シーケンサーによるカキから検出されたノロウイルス遺伝子の網羅的解析

上間 匡 ----- 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 ----- 87

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 ----- 101

2. 市販カキのノロウイルス等汚染実態調査

筒井 理華 他 ----- 107

3. 市販カキからのノロウイルス等の検出状況

佐藤 直人 他 ----- 113

4. 秋田県における市販生カキからのノロウイルス・サポウイルスの検出および2014/2015シーズンのノロウイルス・サポウイルスの検出状況

秋野 和華子 他 ----- 117

5. カキからのノロウイルス抽出法の検討

植木 洋 他 ----- 125

6. 2015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状況

田村 務 他 ----- 131

7. ノロウイルス胃腸炎における感染性粒子推定遺伝子検査法を用いた

発症者および調理従事者の比較

	森 功次 他 -----	143
8.	愛知県におけるノロウイルス流行状況 (2014/15 シーズン)	
	小林 慎一 他 -----	149
9.	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 -----	155
10.	堺市における下水サンプルを用いた下痢症ウイルスの流行解析	
	三好 龍也 他 -----	163
11.	2015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 -----	169
12.	ふき取り検体からのヒドロキシアパタイトによるノロウイルスの 濃縮法の検討	
	重本 直樹 他 -----	173
13.	市販カキからの胃腸炎ウイルス検出状況	
	山本美和子 他 -----	179
14.	感染性胃腸炎から検出されたノロウイルスの分子疫学的解析	
	山下 育孝 他 -----	187
15.	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
16.	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ノロウイルスに よる集団・散発事例の分子疫学解析	
	吉岡 健太 他 -----	201
IV.	研究成果の刊行に関する一覧 -----	213

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 27 年度 総括研究報告書

研究代表者 野田 衛

平成 28 (2016) 年 3 月

平成 27 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・トラップ法によるサポウイルス検出において、LNA (Locked Nucleic Acid) 修飾塩基を導入して Tm 値を上げる手法を用いることで、逆転写, 1st. PCR, 2nd. PCR, 及び real-time PCR の各反応系において検出効率を最適化することができた。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。次世代シーケンサーを用いた解析は、ダイレクトシーケンスで複数の遺伝子型が検出された事例において感染源の推測に有用であった。カキ喫食事例では、カキに含まれる複数種のウイルスの検出が可能であった。カキから従来法および感染性推定法で得た PCR 産物の網羅的ゲノム解析の結果、カキ中には同時に複数の遺伝子型のノロウイルスが含まれることが示された。また、遺伝子型によりカキ体内での生存性に差がある可能性が示唆された。ハイドロキシアパタイトを用いた濃縮法において、付属のリン酸緩衝生理食塩水をダルベッコ PBS(-)に変更し、さらに Zwittergent を添加することで、24~66%の回収率が得られた。検出されたノロウイルス粒子全体に占める感染性が推定される粒子の割合は、発症者および調理従事者において差がなかった。

(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

2015年2月を中心に採取したカキ検体を対象に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。2014/15 シーズンに流行した GII. 17 が半数近くのカキから検出され、2月~3月のカキ関連事例の多発に関連した可能性が

示唆された。また、群別不明のノロウイルスも検出された。サポウイルスはGI. 2等が検出され、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。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。下水中のウイルス汚染量はヒトでの流行が拡大する冬季に増加した。2014/15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、GI. 3, GII. 17, GII. 3などであった。GII. 17は小児感染性胃腸炎からの検出例は少なく、集団事例特にカキ関連食中毒事例から多く検出される傾向が認められ、新型のGII. P17-GII. 17/ Kawasaki308に類似した。GII. 3はGII. P12-GII. 3のキメラウイルスであった。

(3) 食品のウイルス検査の精度管理体制の確立

11機関を対象に、検査方法、検量線作成用標準cDNA溶液および検査担当者をあらかじめ指定する方法で外部精度管理を試行した結果、検査精度の改善が認められた。対数解析で得られた基本統計量を用いることでXbar管理図の管理限界線を|z-スコア|=2の値とすることで評価ができることが示唆された。機関のノロウイルス遺伝子検査で実際に使用している陽性コントロールについて最大280倍の違いがあることが明らかとなり、検査法の精度管理において陽性コントロールの管理が大きな課題であると考えられた。

研究分担者		稲崎 倫子	同上
齋藤 博之	秋田県健康環境センタ	板持 雅恵	同上
	—	嶋 一世	同上
滝澤 剛則	富山県衛生研究所	長谷川 澄代	同上
鈴木 達也	一般財団法人食品薬品安全センター	吉澄 志磨	北海道立衛生研究所
		筒井 理華	青森県環境保健センタ
上間 匡	国立医薬品食品衛生研究所		—
		武差 愛美	同上
		坂 恭平	同上
研究協力者		佐藤 直人	岩手県環境保健研究センター
中阪 聡亮	一般財団法人食品薬品安全センター		—
		高橋 雅輝	同上
梅津 麻実	同上	小野 泰司	同上
秋野 和華子	秋田県健康環境センタ	植木 洋	宮城県保健環境センタ
	—		—
名古屋 真弓	富山県衛生研究所	菅原 直子	同上

田村 務	新潟県保健環境科学研究所
森 功次	東京都健康安全研究センター
宗村 佳子	同上
永野 美由紀	同上
木本 佳那	同上
秋場 哲哉	同上
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
上林 大起	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
中谷 誠宏	同上
岡山 文香	同上
芝田 有理	同上
吉田 永祥	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
山本 美和子	広島市衛生研究所
則常 浩太	同上
藤井 慶樹	同上
八島 加八	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

西村 浩一	熊本県保健環境科学研究所
吉岡 健太	同上
飯塚 節子	島根県保健環境科学研究所
三元 昌美	国立医薬品食品衛生研究所

(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) サポウイルスに対してパンソルビン・トラップ法を用いる際の RNA 検出系の最適化

パンソルビン・トラップ法によるサポウイルス検出系を確立するために、プライマー等を検討し、最適化を図った。

(2) 網羅的ゲノム解析のウイルス性食中毒検査等への適応に関する研究

富山県において 2010 年度から 2012 年度に発生した複数の遺伝子型の重複感染が疑われる 2 事例及びカキ喫食事例 3 事例の患者便等について次世代シーケンサーで解析した。

2015 年 11 月 9 日～30 日に採取されたカキ 25 ロットのうちノロウイルス陽性となった検体について、次世代シーケンサーで解析した。

(3) ふき取り検体からのハイドロキシアパタイトによるノロウイルスの濃縮法の検討

ハイドロキシアパタイトを用いた濃縮方法のふき取り検体への適応とその有用性について検討した。

(4) ノロウイルス胃腸炎における感染性粒子推定遺伝子検査法を用いた発症者および調理従事者の比較

ノロウイルスが検出された集団胃腸炎事例由来の発症者および調理従事者の糞便試料に含まれる感染性をもつと推定されるウイルス粒子の割合について比較を試みた。

(5) カキからのノロウイルス遺伝子検出法の検討

カキからの迅速・簡便なウイルス検査法の開発を目的として、細胞破壊法の遠心条件および蛋白分解酵素処理およびア

ミラーゼ処理の有用性を検討した。

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

全国 10 地方衛生研究所の協力を得て、2015 年 1 月下旬から 2 月上旬を中心に市販カキを購入し、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。

(2) 下水の食品媒介ウイルスの汚染実態調査

下水流入水を対象として、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、散発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

(1) 外部精度管理の試行

検体 7 種 [高濃度検体：3 種、低濃度検体：3 種 (3 種はいずれも同一濃度) および陰性検体：1 種]、および標準 cDNA 溶液を調査検体として配布し、定量検査を各検査機関にて実施した後、回収した結果の解析を行った。繰り返し測定回数は 2 回

とし、検査方法はあらかじめ指定した共通の方法とし、検量線作成用cDNA溶液も共通とした。

(2) 食品からのウイルス遺伝子検出法で用いられる標準DNAのデジタルPCRによるばらつきの検討

協力機関(合計12機関)で実際の検査に使用しているノロウイルスGII陽性プラスミドについて、バイオラッド社のQX200, PCR用試薬としてバイオラッド社のddPCR Supermix for Probesを用いて定量を行った。

(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) サポウイルスに対してパンソルビン・トラップ法を用いる際のRNA検出系の最適化

サポウイルスのRNA検出系について検討した結果、LNA (Locked Nucleic Acid) 修飾塩基を導入してTm値を上げる手法を用いることで、逆転写, 1st. PCR, 2nd. PCR,

及び real-time PCR の各反応系においてサポウイルス遺伝子の検出効率を最適化することができた。

(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等への適応に関する研究

ノロウイルスが検出された集団胃腸炎事例検体について次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析を行ったところ、ダイレクトシーケンスで複数のノロウイルス遺伝子型が検出されていた2事例について、感染源の推測ができた。また、カキ喫食事例では複数のノロウイルス遺伝子型のほか、サポウイルスやアイチウイルスの遺伝子も検出され、カキに含まれた複数種のウイルスへの暴露を示すことができた。

(滝澤研究分担報告)

市販カキから検出されるノロウイルス遺伝子について網羅的解析を試みた結果、厚労省通知法に準じたPCRを用いることでカキに含まれるノロウイルスの網羅的解析が可能であり、1検体から複数の遺伝子型が検出できることが示された。

(上間研究分担報告)

(3) ふき取り検体からのハイドロキシアパタイトによるノロウイルスの濃縮法の検討

ハイドロキシアパタイトを用いた濃縮方法においてふき取りキット付属のリン酸緩衝生理食塩水をふき取り及び再浮遊に使用した場合は低い回収率であったが、ダルベッコ PBS(-)に変更し、更にZwittergentを添加することで回収率が向上した(24-66%)。

(重本研究協力報告)

(4) ノロウイルス胃腸炎における感染性粒子推定遺伝子検査法を用いた発症者および調理従事者の比較

ノロウイルスが検出された集団胃腸炎事例由来の発症者および調理従事者の糞便試料に含まれる感染性をもつと推定されるウイルス粒子の割合について比較した結果、検出されたノロウイルス粒子全体に対する感染性が推定される粒子の割合は、発症者および調理従事者において差がなかった。

(森研究協力報告)

(5) カキからのノロウイルス遺伝子検出法の検討

カキの前処理法として迅速・簡便な細胞破碎法の破碎条件および proteinaseK 及び α -amylase (AM) の 2 種の酵素処理をそれぞれ組み合わせた抽出方法について検討した。その結果、AM 液を使用しカキ中腸腺を 4,500rpm, 15 秒で細胞破碎後、37°C 1 時間の加温により酵素処理を行う方法が抽出条件として最適であることが示された。

(植木研究協力報告)

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

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；7 海域(ロット、1 ロットあたり 6 検体)について検査した結果、生食用カキでは 5 ロットのすべてからノロウイルスが検出されたが、各ロットの陽性率は大きな差がみられた。加熱用カキ 2 ロットのノロウイルス陽性率はどちらも 6/6 と高かった。最も多く

検出されたノロウイルス遺伝子型は GII.17 であり、次いで GII.4_Sydney2012 であった。サポウイルスが生食用 2 ロット及び加熱用 2 ロットから検出されたが、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、2015 年 1 月に購入した市販カキ 8 ロット 16 検体を検査した結果、ノロウイルス GII が 8 ロット 16 検体中 8 ロット 15 検体から検出され、コピー数は 1.32 ~ 71.44 コピー/g であった。遺伝子型別できた 3 株は、GII.3, GII.4_2006b, GII.4_Sydney2012 に分類された。サポウイルスは加熱調理用カキ 1 検体から GI/1 が検出された。

(筒井研究協力報告)

岩手県において、2015 年 2 月に購入した国産の市販カキ 6 ロット 24 検体を対象に検査した結果、ノロウイルスは 3 ロット 8 検体、サポウイルスは 1 ロット 1 検体から検出され、A 型肝炎ウイルスと E 型肝炎ウイルスは全て陰性であった。ノロウイルスの検体別検出率は生食用 9.1% (1/11)、加熱用 53.8% (7/13) 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.17 が 66.7% (8/12) と最も多かった。

(佐藤研究協力報告)

秋田県において、2015 年 1 月に購入した市販生カキについて検査した結果、3 海域の全てからノロウイルス GII, GI およびサポウイルスが検出された。検出ウイルスの遺伝子型は、ノロウイルスでは GII.17, GI.2 が確認され、サポウイルスでは近年、秋田県で検出がなかった GV.1

が検出された。2014/2015 シーズンは秋田県において二枚貝による食中毒事例が多発した。ノロウイルスによる食中毒事例9事例中6事例はカキ等二枚貝が原因と推定された。そのうちの4事例はGIIとGIの混合感染で、遺伝子型も複数認められ、4事例全てからGII.17が検出された。一方、感染症発生動向調査や集団感染事例ではGII.4_Sydney 2012が最も多く、GII.17の検出は散発的であった。

(秋野研究協力報告)

新潟県において、2015年2月に購入した生食用カキ3ロット、加熱用カキ4ロットの生カキについて検索した。検査はRT反応とPCR反応における特異性を重視した反応系を採用し、シーケンス用プライマーを用いたシーケンス反応を行った。その結果、ノロウイルスGIは3ロット5検体から、GIIは6ロット13検体から検出され、遺伝子型別では、GI.2:4検体、GI.4:1検体、GII.17:8検体、GII.4_Sydney2012:3検体、GII.3:3検体、GII.4_2006b:3検体、GII.6:2検体であった。サポウイルス、アストロウイルス、A型肝炎ウイルス、E型肝炎ウイルスは陰性、アイチウイルスは2ロット5検体から検出された。複数のノロウイルスGII遺伝子型が混合していた4検体はシーケンスプライマーを使用することで塩基配列を決定することができた。

(田村研究協力報告)

大阪市において国産市販生カキ13ロットについて検索を行った結果、ノロウイルスが生食用カキ3ロット、加熱調理用カキ2ロットから、サポウイルスが生食用カキ2ロットから検出された。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。

(入谷研究協力報告)

広島県において、2015年2月に購入した市販カキ7ロットについてノロウイルスの検査を実施した結果、カキ中腸腺1g中のウイルス量は、GIが $2.0 \times 10^1 \sim 1.7 \times 10^2$ コピー、GIIが $4.4 \times 10^2 \sim 1.6 \times 10^4$ コピーであり、GIIのコピー数はGIの22~100倍であった。GIではGI.1, 2, 3, 4が、GIIではGII.4, 17が検出された。特にGII.17, GI.2, GI.4が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、2015年2月に購入した市販カキ5ロット20検体からの胃腸炎ウイルスの検出を試みた結果、ノロウイルスが4ロット8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、アストロウイルス、エンテロウイルス、パレコウイルスは検出されなかった。GII.17が4ロット5検体から検出され、GI.2, GII.3, GII.4(Sydney2012), GII.13, GII.21がそれぞれ1検体から検出された。

(山本研究協力報告)

福岡県において、2015年2月に購入した市販カキについて検査した結果、6ロット中6ロット(加熱調理用2ロット、生食用4ロット)から最大60,861コピー/中腸腺1gのノロウイルスが検出され、遺伝子型はGI.1, GI.2, GI.3, GI.4, GII.3およびGII.17であった。

(吉富研究協力報告)

熊本県内において、2015年2月に採取された生食用及び加熱調理用生カキ6ロ

ットについて検査した結果、すべてのロットからノロウイルス遺伝子が検出された。中腸腺 1g あたりのノロウイルス遺伝子量は、最小 894 コピー、最大 3,997 コピーであった。主な検出遺伝子型は、同時期にヒトから検出された遺伝子型と同じであった。

(吉岡研究協力報告)

(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、ノロウイルス、サポウイルスの浸淫状況を調査するため、2015 年の感染性胃腸炎患者、下水流入水からウイルスを検出した。集団発生事例の患者と下水流入水からはノロウイルス GII.17, GII.4 が順に多く検出された。GII.17 は、3 月～5 月の集団発生事例及び 4 月～12 月の下水流入水から多く検出された。小児散発例からは GII.4 が最も多く検出された。

(滝澤研究分担報告)

愛知県において、2014/15 シーズンに採水された流入下水 50 検体のうち、GI 陽性が 42 検体 (84.0%)、GII 陽性が 35 検体 (70.0%) で、GI が高率に検出されたが、両遺伝子型ともに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、下痢症ウイルス及び A 型肝炎ウイルスの流行状況を把握するため、感染性胃腸炎の散発・集団感染事例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遺伝子検出と分子疫学的解析を行った。ノロウイルスは、感染性胃腸炎の流行期に下水中の遺伝子量が増加し、患者由来の遺伝子型のほとんど

が下水からも検出された。サポウイルス、アストロウイルス、アイチウイルスについては、患者からの検出は少数であったが、下水からは高頻度に検出された。

(三好研究協力報告)

福岡県において、終末処理場の流入水中のノロウイルス量は GI では 2015 年 5 月、GII では 2015 年 1 月から 2 月にかけて検出のピークが認められ、2014/15 シーズンのヒトでの流行を反映していた。

(吉富研究協力報告)

(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

愛知県において、2014/15 シーズンに感染性胃腸炎患者から採取された糞便 300 検体について検査した結果、101 検体 (33.7%) からノロウイルス (GI:7 検体)、GII:94 検体) が検出された。GI は GI.2 と GI.3 の 2 遺伝子型、GII は GII.3, GII.4, GII.17 の 3 遺伝子型に型別され、GII.4 が 59.6% を占めた。GII.4 56 株は 2006b と Sydney2012 に分類され、Sydney2012 が大半を占めた。胃腸炎集団発生 24 事例中 13 事例 (54.2%) から GII.17 が検出され、その多くが 2015 年 1 月～4 月の発生事例からの検出であった。

(小林研究協力報告)

大阪市において、2015 年 1 月～12 月の集団胃腸炎 75 事例からノロウイルスが検出された。2015 年 1 月～3 月には稀な遺伝子型であるノロウイルス GII.17 による胃腸炎事例が多発した。本ウイルスは同時期にアジアで流行していた新しい遺伝子型である GII.P17-GII.17 株であった。

(入谷研究協力報告)

愛媛県において、2015 年 1 月～12 月の

間に感染性胃腸炎から検出されたノロウイルスは 105 例 (GII が 65 例, GI が 40 例) で, 例年に比べ GI の検出割合が高かった。遺伝子型別にみると, GI では, GI. 3 が 31 例, GI. 2 が 2 例, GII では, GII. 4 が 23 例, GII. 3 が 22 例, GII. 17 が 14 例, GII. 6 が 1 例であった。6 月～8 月にノロウイルス GI. 3, 6 月～7 月にサポウイルス, 6 月にアストロウイルスの検出数が増加した。ノロウイルス GII. 4 の多くは Sydney2012 であり, GII. 3 は GII. P12-GII. 3 のキメラウイルスであった。過去に検出例がない GII. 17 が 2 月～4 月に検出された。これらの遺伝子型の株は非常に近縁であり, GII. P17_GII. 17/Kawasaki308 と高い相同性を示した。

(山下研究協力報告)

熊本県において, 2014/15 シーズンに感染性胃腸炎 (散发事例: 12 事例, 集団事例: 6 事例) から検出されたノロウイルスの遺伝子解析を行ったところ, 遺伝子型は GI. 3, GII. 4, GII. 17 であった。系統樹解析の結果, GII. 4 株は 2006b 及び Sydney2012 であり, GII. 17 株は Kawasaki308 株と近縁であった。

(吉岡研究協力報告)

3. 食品のウイルス検査の精度管理体制の確立

(1) 外部精度管理の試行

11 機関を対象に精度管理を実施した結果, 検査機関で調製した陰性コントロールではいずれの検査機関も陰性と判定したが, 陰性検体において 1 機関が低濃度ながらも検出した。陽性の 6 検体についてはいずれの検査機関も検出した。なお, 同一濃度である高濃度検体の 3 種間およ

び低濃度検体の 3 種間における報告値の平均値に有意差は認められなかった。このとき報告された実測値の実数解析における変動係数は標準 cDNA 溶液においては 6%であったが, 高濃度および低濃度検体ではいずれも 50～70%であった。一方, 対数解析による高濃度検体の実測値において変動係数が 12～15%へと低下したが, 低濃度検体においてはほとんど変化が認められなかった。これに対して, 対数解析による高濃度検体, 低濃度検体の換算値ではいずれも変動係数が 5～9%に低下した。

(鈴木研究分担報告)

(2) 食品からのウイルス遺伝子検出法で用いられる標準 DNA のデジタル PCR によるばらつきの検討

各機関のノロウイルス遺伝子検査で実際に使用している陽性コントロールについてデジタル PCR を用いて同時に定量を行い, 機関間のばらつきの現状の確認を行ったところ, 最大 280 倍の違いがあることが明らかとなった。

(上間研究分担報告)

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) サポウイルスに対してパンソルビン・トラップ法を用いる際の RNA 検出系の最適化

パンソルビン・トラップ法によるサポウイルス検出系を最適化できた。本研究では, 各種プライマーの Tm 値を調整するために LNA 修飾を多用している。プライマー設計に当たっては, 両プライマーの

Tm 値をそろえることが基本となるが、ゲノムの多様性に富むサポウイルスの場合は、配列の保存領域が優先されるため、Tm に関して最適化するのには難しかった。LNA 修飾を導入することで、塩基配列はそのまま Tm 値だけを上げることが可能となるため、他のプライマー設計の際にも役立つものと考えられる。また、LNA 修飾を導入することにより、感度自体が向上することから、パントラ法以外の日常的な糞便検査に取り入れることにも意義がある。

(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等への適応に関する研究

ノロウイルスの検出された胃腸炎事例の患者及び従業員の検体について、メタゲノム解析を行った結果、従来法では感染源の特定が困難な事例で感染源の推定ができた。また、生ガキを喫食していた事例では患者はカキに存在した複数種のウイルスに暴露していた可能性が示唆される結果が得られた。一方、メタゲノム解析で検出される配列には、ノロウイルスの遺伝子型別判定が可能な配列が含まれるとは限らず、型別判定の困難な場合があった。そのため、PCR 法による確認や PCR 産物を次世代シーケンサーで解析する方法なども考慮する必要があると考えられた。

(滝澤研究分担報告書)

市販カキについて次世代シーケンサーによるノロウイルス遺伝子型の網羅的検出をおこなった結果、カキ中には同時に複数の遺伝子型のノロウイルスが含まれるとともに、遺伝子型によってカキ体内

での生存性に差がある可能性が示唆された。今後は患者検体や環境検体などに応用し、カキからの検出遺伝子型との相関性の解明につながることを期待できる。

(上間研究分担報告)

(3) ふき取り検体からのヒドロキシアパタイトによるノロウイルスの濃縮法の検討

ヒドロキシアパタイトを用いたノロウイルス濃縮法は、特別な機器が不要で短時間で濃縮可能である。今回の検討により、ふきとり検体からのノロウイルス濃縮に適応できる可能性が示唆された。

(重本研究協力報告)

(4) ノロウイルス胃腸炎における感染性粒子推定遺伝子検査法を用いた発症者および調理従事者の比較

発症者および調理従事者において、排出ウイルス中の感染性をもつと推定される粒子の存在割合に差がないことが確認できたことから、ノロウイルスが検出された調理従事者については、確実に調理作業への従事を制限していくことが、集団胃腸炎の発生予防および拡大防止に重要であると思われた。

(森研究協力報告)

(5) カキからのノロウイルス遺伝子検出法の検討

細胞破壊法の遠心条件の変更およびアミラーゼ処理の導入によりカキからのノロウイルスの検出の高感度化が図れた。出荷前の自主検査等に有用と考えられる。

(植木研究協力報告)

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。2015年2月を中心に全国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.17が検出され、ヒトでの流行を反映するとともに、GII.17のカキへの蓄積が2～3月のカキ関連食中毒事例の多発に繋がったものと推察された(吉澄、筒井、佐藤、秋野、田村、入谷、重本、山本、吉富、吉岡研究協力報告)。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。カキから群別・型別不明のノロウイルスも検出された(吉澄研究協力報告)が、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(筒井、田村、入谷、重本、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(吉澄、秋野研究協力報告)、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。検体採取時期の問題もあり、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

堺市における下水調査において、感染性胃腸炎患者数の増加する冬季に下水のノロウイルス遺伝子の定量値が増加し、ほとんどの調査月で下水からノロウイルスが検出されたことから、下水調査により流行解析や変異株の出現などを早期に探知することが可能と考えられた。2015年の下水中のノロウイルス遺伝子量が過去2年間と比べ低値であった原因は不明であるが、感染性胃腸炎患者数も過去2年間比べ少し低値であったことから、ノロウイルス感染者が少数であった可能性が考えられた。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、感染症発生動向調査の感染性胃腸炎として顕在化しないウイルス感染、流行があることが示唆された。

(三好研究協力報告)

富山県において、ノロウイルスGII.4(Sydney2012が中心)が小児散発例、

集団事例、下水から年間を通じて検出されており、2014年までと同様にこの型が流行していたと考えられる。GII.17は3月から5月に集団発生事例から多く検出されたが、下水からは患者のみられなかった7月から12月まで検出されたことから、この期間にも感染者が継続して存在していたと考えられた。検出株はいずれもKawasaki308/2015/JPに近縁であった。

(稲崎研究分担報告書)

愛知県において、下水検体からGIが9遺伝子型、GIIが6遺伝子型と多様なノロウイルス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、下水検体からも検出されたが、GIは散発、集団発生事例からの検出が少数であるのに対し、下水からは高率に検出された。この結果は、ノロウイルスの成人の間での流行や、不顕性感染などを反映しているものと考えられる。下水中のノロウイルスの動態を調査することは、本ウイルスの発生動向を把握する手段として有用であり、流行株の早期探知や流行予測への活用につなげたい。小児感染性胃腸炎の原因としてはGII.4(Sydney2012, 2006b)が中心で、集団発生事例はGII.17が過半数を占め、特に2015年1月～4月に高頻度に検出された。

(小林研究協力報告)

福岡県における下水調査から、2014/15シーズンはノロウイルスのGIとGIIがともに流行し、シーズン前半はGIIが、後半はGIが流行したことが示唆された。この下水流入水中のノロウイルスの消長は感染性胃腸炎や食中毒等の集団事例からのノロウイルスの検出結果とよく相関し

ており、ヒトでのノロウイルスの流行状況を反映していると考えられた。また、流行期の流入水に含まれる量はGI、GIIともに 10^7 コピー/Lを超えており、この値が流行の指標となることが示唆された。

(吉富研究協力報告)

(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

大阪市において、2014年12月まではノロウイルスGII.3(保育所等)、2015年1月～3月はGII.17による事例が多発した。GII.17による事例の多くは食中毒や高齢者施設における集団事例であり、主に成人層における流行であった。GII.17は新たな遺伝子型のGII.P17-GII.17であった。本株は同時期に国内他地域やアジアで流行していた株と非常に近縁であり、本株が国内だけでなく、国を越えて広く流行していたことが示唆された。

(入谷研究協力報告)

愛媛県において、例年ノロウイルスGIの割合は少ないが、2015年は38.1%を占めた。その約94%がGI.3で、6月～8月に多数検出された。また6月～7月にサポウイルス、6月にアストロウイルスが多く検出され、これらが夏季に感染性胃腸炎患者数が多発した要因と考えられた。

ノロウイルスGIIでは、GII.4(Sydney2012が主流)、GII.3(GII.P12-GII.3のキメラウイルス)、GII.17が多かった。GII.17はGII.P17-GII.17/Kawasaki308と高い相同性を示し、2月～4月に集中して検出された。しかし、感染性胃腸炎患者数の増加はみられていないことから、流行が広

範囲に及んでいなかったか、あるいは GII.4 等の遺伝子型に比べて症状が軽いか不顕性感染が多い可能性が示唆された。

(山下研究協力報告書)

熊本県において、2014/15 シーズンに感染性胃腸炎の散発事例及び集団事例から検出されたノロウイルスの遺伝子型は GI.3, GII.4, GII.17 の3種類であり、全国の流行状況と一致した。ノロウイルスは冬季に流行する感染性胃腸炎の主要な原因ウイルスとして注目されており、近年、流行における特定の遺伝子型の優位性や新型の出現等が確認されていることから、今後も継続して流行状況の把握及び分子疫学解析を行っていくことが重要である。

(吉岡研究協力報告)

3. 食品のウイルス検査の精度管理体制の確立

(1) 外部精度管理の試行

今回、検査方法、検量線作成用標準 cDNA 溶液および検査担当者をあらかじめ指定することにより、検査精度の改善が認められた。また、得られた報告値について実数解析および対数解析を実施したところ、変動係数から判断して対数解析がより適切であると考えられた。対数解析で得られた基本統計量をもとに各検査機関の評価を行うため、z-スコアおよび \bar{X} -R 管理図を採用したところ、 \bar{X} -R 管理図の管理限界線を $|z\text{-スコア}|=2$ の値とすることで評価ができることが示唆された。しかし、今回の結果が限定的なものである可能性も否定できないことから、評価方法の決定には基本統計量の継続的な推移を観察することが必要であると考

えられた。

(鈴木研究分担報告)

(2) 食品からのウイルス遺伝子検出法で用いられる標準 DNA のデジタル PCR によるばらつきの検討

機関のノロウイルス遺伝子検査で実際に使用している陽性コントロールについて最大 280 倍の違いがあることが明らかとなり、検査法の精度管理において陽性コントロールの管理が大きな課題であると考えられる。

(上間研究分担報告)

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

食品からのウイルス検出法の開発として、パンソルビン・トラップ法によるサポウイルス検出において、LNA (Locked Nucleic Acid) 修飾塩基を導入して T_m 値を上げる手法を用いることで、検出効率を最適化することができた。

次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析では、ダイレクトシーケンスで複数の遺伝子型が検出された事例では感染源の推測に有用であった。カキ喫食事例では、複数のノロウイルス遺伝子型やサポウイルス、アイチウイルスの遺伝子が検出され、カキに含まれた複数種のウイルスの検出が可能であった。

ハイドロキシアパタイトを用いた濃縮法において、付属のリン酸緩衝生理食塩水をダルベッコ PBS(-)に変更し、さらに Zwittergent を添加することで、24-66% の回収率が得られた。

カキから従来法および感染性推定法で

得た PCR 産物の網羅的ゲノム解析の結果、カキ中には同時に複数の遺伝子型のノロウイルスが含まれることが示された。また、遺伝子型によってカキ体内での生存性に差がある可能性が示唆された。

検出されたノロウイルス粒子全体に対する感染性が推定される粒子の割合は、発症者および調理従事者において差が認められなかった。

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

2015 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。2014/15 シーズンに流行した GII. 17 が半数近くのカキから検出され、2 月～3 月のカキ関連事例の多発に関連した可能性が示唆された。GII. 17 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、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。

(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ものの、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。下水中のウイルス汚染量もヒトでの流行が拡大する冬季に増加した。

(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

2014/15 シーズンにおけるノロウイルスの主な流行株は GII. 4_Sydney2012, GI. 3, GII. 17, GII. 3 などであった。GII. 17 は小児感染性胃腸炎からの検出例は少なく、集団事例、特にカキ関連食中毒事例から多く検出される傾向が認められ、新型の GII. P17-GII. 17/Kawasaki308 に類似した。GII. 3 は GII. P12-GII. 3 のキメラウイルスであった。

3. 食品のウイルス検査の精度管理体制の確立

11 機関を対象に、検査方法、検量線作成用標準 cDNA 溶液および検査担当者をおらかじめ指定する方法で外部精度管理を試行した結果、検査精度の改善が認められた。対数解析で得られた基本統計量を用いることで \bar{X} 管理図の管理限界線を $|z\text{-スコア}|=2$ の値とすることで評価ができることが示唆された。

各機関のノロウイルス遺伝子検査で実際に使用しているノロウイルス GII 陽性コントロールにおいて最大 280 倍の違いがあった。

F. 健康危害情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Hiroyuki Saito, Miho Toho, Tomoyuki Tanaka and Mamoru Noda: Development of a practical method to detect noroviruses contamination in composite meals. Food and Environmental Virology, 7(3), 239-248 (2015)
2. Miranda de Graaf, Janko van Beek, Harry Vennema, Alexander T. Podkolzin, Joanne Hewitt, Filemon Bucardo-Rivera, Kate Templeton, Janet Mans, Johan Nordgren, Reuter Gábor, Maureen Lynch, Lasse Dam Rasmussen, Nobuhiro Iritani, Martin C. Chan, Vito Martella, Katia Balay, Jan Vinjé, Peter A. White, Marion P. Koopmans: Emergence of a novel GII.17 norovirus - End of the GII.4 era?, Eurosurveillance 20(26), pii=21178 (2015)
3. 斎藤博之, 秋野和華子, 佐藤寛子, 柴田ちひろ, 佐藤由衣子, 安部真理子, 飯塚禮子, 木内雄: 死亡例を含む A 型肝炎の家族内感染事例, 病原微生物検出情報, 36(5), p15 (2015)
4. 斎藤博之, 野田衛: 食品・臨床材料・ふき取りの前処理法, 食品衛生検査指針 2015 (微生物編), 607-617 (2015)
5. 斎藤博之: 一本鎖高次構造多形 (SSCP) 解析法, 食品衛生検査指針 2015 (微生物編), 648-654 (2015)
6. 上林大起, 改田 厚, 阿部仁一郎, 久保英幸, 山元誠司, 入谷展弘, 西尾孝之, 伯井紀隆, 森宏美, 西 貴美, 安井典子, 榊田晴美, 細井舞子, 青木理恵, 坂本徳裕, 廣川秀徹, 半羽宏之, 松本健二, 吉村高尚: コクサッキーウイルス B4 型が検出された集団胃腸炎について—大阪市, 病原微生物検出情報 月報 36(No. 428), 197-198 (2015)
7. 上林大起, 左近直美, 入谷展弘, 三好龍也, 改田厚, 阿部仁一郎, 山元誠司, 久保英幸, 平井有紀, 内野清子, 吉田永祥, 岡山文香, 芝田有理, 塚田和宏, 駒野淳, 弓指孝博, 西尾孝之, 加瀬哲男, 田中智之, 高橋和郎: 大阪府内におけるノロウイルスの流行状況 (2010-2013), 大阪府立公衆衛生研究所報告 53, 15-21 (2015)
8. 楠原 一 赤地重宏 小林隆司 西中隆道 小林真美 山口江里 岩出義人 田沼正路 野田 衛 (2015) ノロウイルス GII. 17 型の流行とその特徴について—三重県, 病原微生物検出情報, 36, 91-92
9. 入谷展弘, 山元誠司, 改田 厚, 上林大起, 久保英幸, 野田 衛: 2014~2015 シーズンに流行したノロウイルス GII. 17 について, 食品衛生研究 65(10), 7-15 (2015)
10. 入谷展弘, 山元誠司, 改田厚, 阿部仁一郎, 久保英幸, 平井有紀, 上林大起, 野田 衛, 西尾孝之: 2014-2015 シーズンに大阪府で認められたノロウイルス流行, 大阪府立環境科学研究所報告 調査・研究年報 77,