

13-16 (2015)

11. 野田 衛 (2015) ノロウイルスによる食中毒, 食の安全と安心を科学する会 食の安全・安心 Q&A 特別企画, 12/17
12. 野田 衛 (2015) ノロウイルス食中毒の予防対策, 日本栄養士会雑誌, 58(11), 16-21
13. 野田 衛 (2015) 汚染リスクを知って予防しよう! ウイルス性食中毒, 食と健康, 706, 8-18

## 2. 学会発表

1. 斎藤博之, 秋野和華子, 野田衛: (2015) パンソルビン法によって得られたサポウイルス RNA 検出系の最適化, 第 63 回日本ウイルス学会学術集会, 福岡市, 11/22
2. 吉富秀亮, 芦塚由紀, 野田 衛 (2015) 市販カキから検出されたノロウイルス GII. 17 の分子疫学解析, 第 36 回日本食品微生物学会学術総会, 川崎市, 11/30
3. 斎藤博之, 秋野和華子, 田中智之, 野田衛: 食品のウイルス検査法における捕捉抗体の供給源に関する研究, 第 25 回秋田応用生命科学研究会講演会, 2015, 秋田
4. 斎藤博之, 秋野和華子, 田中智之, 野田衛: 食品検体の病原ウイルス検査にパンソルビン・トラップ法を用いる際の捕捉抗体供給源に関する検討, 第 110 回日本食品衛生学会学術講演会, 2015, 京都
5. 斎藤博之, 秋野和華子, 野田衛: LNA (Locked Nucleic Acid) 修飾プライマーを用いたサポウイルス RNA 検出系の最適化, 秋田応用生命科学研究会 第 26 回講演会, 2015, 秋田
6. 斎藤博之, 秋野和華子, 野田衛: 食品のサポ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 36 回日本食品微生物学会学術総会, 2015, 川崎
7. 三元昌美, 小菅大嗣, 上間 匡, 野田 衛 (2015) 感染性推定遺伝子検査法を用いた高圧処理によるノロウイルスに対する不活化効果の検証, 第 110 回日本食品衛生学会学術講演会, 京都市, 10/30
8. 山下照夫, 安達啓一, 伊藤 雅, 廣瀬絵美, 中村範子, 尾内彩乃, 安井善宏, 小林慎一, 皆川洋子: 下水から検出されるコブウイルスの長期的遺伝子解析, 第 63 回日本ウイルス学会学術集会, 福岡市, 11/22 (2015)
9. 秋野和華子, 斎藤博之, 野田衛: 食品のウイルス検査における偽陽性防止対策に関する検討, 第 36 回日本食品微生物学会学術総会, 2015, 川崎
10. 小菅大嗣, 上間 匡, 小西良子, 野田 衛 (2015) 市販アルコール系消毒剤によるネコカリシウイルス不活化効果の比較, 第 110 回日本食品衛生学会学術講演会, 京都市, 10/30
11. 上間 匡, 照山晏菜, 堀内百恵, 浅川 愛, 三元昌美, 野田 衛 (2015) カキからのノロウイルス検出における通知法, 改良法, 感染性推定遺伝子検査法の比較, 第 110 回日本食品衛生学会学術講演会, 京都市, 10/30
12. 森功次ほか: 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. 第 36 回日本食品微生物学会学術総会, 2015, 川崎市
13. 菅原直子, 木村俊介, 鈴木優子, 佐々木美江, 植木洋, 渡邊節, 真砂佳史, 大村達夫, 野田衛: カキからのノロウイルス抽出法の検討, 第 36 回日本食品衛生微生物学会学術総会, 川崎市
  14. 中村範子, 尾内彩乃, 廣瀬絵美, 安達啓一, 伊藤 雅, 安井善宏, 小林慎一, 山下照夫, 皆川洋子: 愛知県における胃腸炎ウイルスの流行状況 (2008/09~2013/14), 第 63 回日本ウイルス学会学術集会, 福岡市, 11/22 (2015)
  15. 入谷展弘, 山元誠司, 改田 厚, 阿部仁一郎, 上林大起, 久保英幸, 野田 衛: 大阪市におけるノロウイルス GII.17 の流行状況, 第 63 回日本ウイルス学会, 福岡 (2015. 11. 22-24)
  16. Noriko Inasaki, Mayumi Nagoya, Masae Itamochi, Ichiyo Shima, Masatugu Obuchi, Ryo Inahata, Sumiyo Hasegawa, Makoto Kuroda, Tetsutaro Sata, Takenori Takizawa: Detection of sapovirus GV.2 by the next generation sequencer in the stool specimens of patients of gastroenteritis outbreak from which pathogen had not been identified. FEMS 2015 (第 6 回欧州微生物学会議), マーストリヒト, 平成 27 年 6 月 9 日
  17. 名古屋真弓, 稲崎倫子, 嶋一世, 板持雅恵, 稲畑良, 小淵正次, 野田衛, 佐多徹太郎, 滝澤剛則: 胃腸炎集団発生事例のメタゲノム解析によるノロウイルスの検索. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会, 福岡市, 平成 27 年 11 月 22 日
- H. 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

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 研究分担報告書

斎藤 博之  
滝澤 剛則  
鈴木 達也  
上間 匡  
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出法に関する研究」

研究分担報告書

## 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

研究分担者	斎藤博之	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(ブ菌)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 には大量のブ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、大量のブ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。これまでに、ノロウイルス RNA の検出系に関しては、ブ菌の影響を最小限にする反応条件が検討されたが、本年度はサポウイルスについて RNA 検出系の最適化を図った。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 SaV 遺伝子の検出効率を最適化することができた。

### 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ノロウイルスを含む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ことから、平成 25 年度に反応系等の最適化を行った。今年度は、ノロウイルスと並んで食中毒原因物質となり得るサポウイルスの RNA 検出系の最適化を図った。

## 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を用いた。また、検出対象となるウイルスとして、SaV-GII.1.1 (AB685711)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 HDM Labs Inc 社の試薬用 5%ガンマグロブリン製剤を用いた。Advy Japan 社から購入した。

#### 3) パンソルビン

黄色ブドウ球菌(ブ菌)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 (Thermo Fischer Scientific)

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) アミラーゼ

枯草菌由来  $\alpha$ -Amylase 粉末(和光純薬)を液化調製(平成 25 年度報告書参照)して使用した。

#### 9) 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。

#### 10) 逆転写酵素

ReverTraAce(東洋紡)を使用した。

#### 11) conventional PCR 用酵素

1st.PCR には KAPA2G Robust HotStart PCR Kit (KAPA BIOSYSTEMS)を用いた。反応は添付 buffer A を使用し、 $Mg^{2+}$ を 4.5mM に増量し、基質として dUTP を添加した系(平成 25 年度報告書参照)により行った。

2nd. PCR には AptaTaq Fast PCR Master (Roche Diagnostics)を用いた。このとき酵素をホットスタート化するため、anti-Taq high(東洋紡)を添加した。

#### 12) 逆転写反応に用いたプライマー

ランダム 9mer、及び、逆転写反応専用プライマー-PANR-SV (表 4)を用いた。

#### 13) conventional PCR に用いたプライマー

Kitajima らの方法 (Appl. Environ. Microbiol., 76, 2461-2467, 2010.)に記載のあるプライマー、及びそれらを元に LNA

(Locked Nucleic Acid) 修飾 (Mol. Cell. Probes, 17, 253-259, 2003) を加えたプライマーを用いた (表 1、表 2)。

#### 14) conventional PCR 装置

アステック社製「PC-320」を用いた。

#### 15) real-time PCR 装置

ロシュ社製「LightCycler 480」を用いた。

#### 16) real-time PCR 用酵素

ロシュ社製「LightCycler 480 Probe Master」を用いた。

#### 17) real-time PCR 反応系

Oka らの方法 (J. Med. Virol., 78, 1347-1353, 2006) に従った。プライマーについては一部に LNA 修飾を加えた (表 3)。

### 3. 検討の順番

次の 2 項目について反応条件の最適化を行った。

#### (1) 逆転写反応系の最適化

#### (2) PCR 反応系の最適化

なお、プロトコル上の順番は (1)→(2) 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 (2)→(1) とした。すなわち、最初に (2) の検討と最適化を行い、次に (1) を検討する (最適化済みの (2) 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、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。この時、平

成 25 年に検討したオンカラム DNase I 処理 (図 2) を組み入れた。

### 5. PCR の反応条件に関する検討

$5 \times 10^5$  コピー/ $\mu$ L の SaV GI.1 c DNA を蒸留水、及びパントラ抽出物で段階希釈することで、被検体を調製した。これらを、表 1 に示した Kitajima 法の 1st. PCR プライマー、及びそれらに LNA 修飾を加えたプライマーを用いた反応系で増幅を行い、検出効率を比較した。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。サーマルサイクラーの設定条件は、原法のアニーリング温度に従って、

95°C 2 分 1 サイクル

95°C 30 秒-50°C 30 秒-72°C 60 秒 40 サイクル

72°C 7 分 1 サイクル

を行った。また、検討条件としてアニーリング温度を 60°C に設定し、

95°C 2 分 1 サイクル

95°C 30 秒-60°C 30 秒-72°C 60 秒 40 サイクル

72°C 7 分 1 サイクル

を行った。

次に、 $5 \times 10^3$  コピー/ $\mu$ L の SaV GI.1 c DNA を DW とパントラ抽出物で段階希釈したものを被検体とし、表 2 に示した Kitajima 法の 2nd. PCR プライマー、及びそれらに LNA 修飾を加えたプライマーを用いた反応系について検討した。反応プログラムは、アニーリング温度を 60°C に設定し、

95°C 2 分 1 サイクル

95°C 30 秒-60°C 30 秒-72°C 30 秒 40 サイクル

72°C 7 分 1 サイクル

を行った。

さらに、SaV GI.1 cDNA を  $10^1 \sim 10^3$  コピー投入した反応系において、表 3 に示した real-time PCR に用いるプライマー・プローブセットの内、 $T_m$  値が低い SaV1245R に LNA 修飾を加えたものについて検討した。

## 6. 逆転写反応に関する検討

$2 \times 10^6$  コピー/ $\mu\text{L}$  の SaV GI.1 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。ランダムプライマー、または表 4 に示した逆転写反応専用プライマー-PANR-SV を用いて cDNA を合成した。PANR-SV は PANR-SVa、PANR-SVb、PANR-SVc を縮重度に応じて 6:3:1 で混合して調製した。反応温度は、 $42^\circ\text{C}$  にて行った。反応容量は  $20 \mu\text{L}$  で、上記被検体が  $10 \mu\text{L}$  含まれるようにした。30 分の逆転写反応後、蒸留水を  $20 \mu\text{L}$  加えたもの (2 倍希釈) を  $5 \mu\text{L}$  取り、先に最適化を済ませた conventional PCR と real-time PCR の反応系により増幅効率を比較した。

## C. 研究結果

### 1. PCR の反応条件に関する検討

図 3 に示したとおり、原法どおりにアニーリング温度を  $50^\circ\text{C}$  に設定した場合は、DW による希釈系列では  $10^{-4}$  希釈まで増幅バンドが検出されたが、パントラ抽出物による段階希釈系列では  $10^{-2}$  希釈までしか検出されなかった。一方で、ブ菌 16s リボソーム由来のバンドが検出された (シーケンスにより確認)。アニーリング温度を  $60^\circ\text{C}$  まで高めたところ、ブ菌由来のバンドは消失したものの、SaV のバンドもほとんど認められなくなった。表 1 に示したプライマーの中で、特に  $T_m$  値

が低い R13 と R14 について、LNA 修飾を加えて  $T_m$  値を向上させたもの (R13-L5、及び R14-L4) を用いたところ、アニーリング温度  $60^\circ\text{C}$  の設定であっても  $10^{-4}$  希釈まで SaV のバンドを検出できるようになった。

図 4 に示したとおり、 $T_m$  値の低い SaV1245Rfwd に LNA 修飾プライマーを用いた反応系では、パントラ抽出物存在下でも  $10^{-4}$  希釈までバンドを検出できた。

図 5 に示したとおり、 $T_m$  値の低い SaV1245R に LNA 修飾プライマーを用いることで、real-time PCR の感度が全体的に向上し、パントラ抽出物存在下でも  $10^1$  コピーまで検出できた。

### 2. 逆転写反応に関する検討

図 6 に示したとおり、ランダムプライマーを用いた逆転写反応においては、DW による段階希釈系列では  $10^{-5}$  希釈まで増幅バンドが認められたが、パントラ抽出物による段階希釈系列では  $10^{-3}$  までしか検出できなかった。一方で、ブ菌由来のバンドが観察された。PANR-SV による逆転写反応を行ったところ、パントラ抽出物存在下でも  $10^{-5}$  希釈まで SaV のバンドが検出できた。ブ菌由来のバンドも残存したが、1st. PCR 産物に対して 2nd. PCR を行うことで SaV の遺伝子だけを増幅できた。また、real-time PCR を用いた反応系でも、PANR-SV を用いた逆転写反応で  $10^{-5}$  希釈まで検出できることが確認された (図 7)。

## D. 考察

### 1. 検討の順番

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

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。NoVについては、平成 25 年に RNA 検出系の最適化を行っており、その際にアミラーゼ粉末の液化調製やオンカラム DNase I 処理などの改良も実施した。本研究では、NoV の場合と同様に、パントラ抽出物による負荷試験を中心に SaV の RNA 検出系に対して最適化を図った。酵素の選定については平成 25 年度の研究で結果を示していることから、次の 2 点に関してプライマー設計の視点から検討した。

(1) 逆転写反応系の最適化

(2) 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(2)→(1)とした((1)→(2)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 反応条件に関する検討

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 SaV の遺伝子配列由来の cDNA 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、大量のブ菌遺伝子の存在下という負荷的条件を設定している。

表 1 に示した Kitajima 法の 1st.PCR プ

ライマーの中で、R13 と R14 の Tm が特に低くなっている。PCR のアニーリング温度は最も Tm 値の低いプライマーに合わせて設定されるため、原法では 50°C となっている。この条件下では、SaV cDNA を DW で段階希釈した場合には十分な感度が得られているものの、パントラ抽出物存在下ではブ菌の遺伝子にも非特異な反応が起こり、SaV 遺伝子の増幅が阻害されている(図 3)。一般的に、PCR の特異性を向上させるためには、アニーリング温度を高く設定するのがよいとされているが、60°C のアニーリングでは、ブ菌の非特異バンドは抑制されたものの、SaV に対する検出感度も低下した。そこで、高いアニーリング温度と検出感度を両立させるためには、プライマーの Tm 値そのものを高めてやればよいことになる。その方法の一つとして LNA 修飾があり、表 1 では R13 と R14 に対して導入することで、Tm 値を向上させている。このような改良を加えた R13-L5 と R14-L4 を用いた上で、アニーリング温度を 60°C に設定した PCR を行うと、図 3 に示したように、パントラ抽出物存在下でも十分な検出感度が得られた。

表 2 に示した Kitajima 法の 2nd. PCR で用いるプライマーの内、SaV1245Rfwd の Tm 値が低いため、LNA 修飾を加えることで、もう一方のプライマーである R2 と Tm 値をそろえることができた。原法では、2nd.PCR のアニーリング温度も 50°C に設定されていたが、こうした改良を加えることで、60°C のアニーリングが可能となり、パントラ抽出物存在下でも十分な感度が得られた(図 4)。

表 3 には Oka らの方法で用いられている real-time PCR のプライマー・プローブセッ



トを示したが、この中でSaV1245Rだけが他のプライマーよりもT<sub>m</sub>値が低くなっている。原法のアニーリング温度が62°Cに設定されていることから、それよりもT<sub>m</sub>値が低いことで不都合が生じる可能性がある。Probeに使われているオリゴDNAもT<sub>m</sub>値が低いが、MGB修飾によって鋳型に対する親和性が高められているため問題は無い。図5を見ると、原法の条件では低濃度領域で検出感度が低下し、パントラ抽出物存在下では、その傾向が著しい(検出できない)ことがわかる。そこで、SaV1245RにLNA修飾を加えて、他のプライマーと同等のT<sub>m</sub>値まで向上させたSaV1245R-L3を用いて、同じ被検体からの検出を試みたところ、全体的に感度が高められ、パントラ抽出物存在下でも十分な検出感度が得られた。

### 3. 逆転写反応に関する検討

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、SaV RNAをパントラ抽出物で段階希釈した被検体を用いた。表4に示したプライマーを用いて逆転写反応を行った後は、最適化の済んだconventional PCR、またはreal-time PCRで結果を比較検討した。

図6に示したとおり、DWによる段階希釈系列では、ランダムプライマーでも10<sup>-5</sup>希釈までバンドが認められるが、パントラ抽出物存在下では、10<sup>-3</sup>希釈までしか検出できず、ブ菌による非特異増幅バンドが目立つ結果となった。逆転写反応専用プライマーPANR-SVを用いることで、10<sup>-5</sup>希釈まで検出できるようになり、2nd. PCRを行うことで確実にSaV遺伝子を増幅することができた。

同じ希釈系列の被検体をreal-time PCRと比較したところ、PANR-SVを用いることで10<sup>-5</sup>希釈まで検出できた。

### 4. まとめと今後の課題

本研究では、各種プライマーのT<sub>m</sub>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、Forward側とReverse側のプライマーのT<sub>m</sub>値をそろえることが基本となるが、SaVのように塩基配列が多様性に富んでいるウイルスの場合は、配列の保存領域が優先されるため、T<sub>m</sub>に関して最適化するのは難しかった。LNA修飾を導入することで、塩基配列はそのままT<sub>m</sub>値だけを向上させ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、図5に示されたように、感度が全面的に向上することから、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。なお、本稿ではSaV GI.1を試験材料としたが、GI.2、GII.3、GIV.1、GV.1についても同様の結果が得られることを確認している。

平成25年に行ったNoV RNAの検出系に関する検討では58°Cの高温逆転写反応を行ったが、SaVの場合は42°Cで差支えなかったため、コスト的に低廉なReverTraAceを用いた。

他の食中毒起因ウイルスとしては、近年報告が増加しつつあるE型肝炎ウイルス等への適用を進める必要があるが、捕捉抗体の供給源を確保することが重要である。同様にNoVやSaVであっても、新たな型に対応するためには、疫学調査と並行して捕捉抗体の見直しを継続していかなければならない。

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殖せ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となってしまう。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。加えて、今後はウイルスの回収効率を客観的に評価する必要性も生じてくることから、内部標準物質の使用についても検討を進める必要がある。

#### E. 結論

パントラ抽出物は多くのブ菌遺伝子を含むことから、その中に微量に存在するウイルス RNA を検出するには、逆転写や PCR の反応系を工夫する必要がある。糞便検体では問題なく実施できていた反応系であっても、パントラ抽出物存在下では不都合を起こす場合があることから、最適化は重要である。これまでに NoV RNA 検出系に関しては最適化の検討を行ってきたが、今年度は SaV について実施した。逆転写反応、1st. PCR、2nd. PCR、real-time PCR の各反応系について、弱点となる Tm の低いプライマーに LNA 修飾を加えることで、高温での反応を可能にし、SaV 遺伝子の検出効率を最適化させることができた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) 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)

2) 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)

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) 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. 学会発表

1) 斎藤博之、秋野和華子、田中智之、野田衛: 食品のウイルス検査法における捕捉抗体の供給源に関する研究、第 25 回秋田応用生命科学研究会講演会、2015、秋田

2) 斎藤博之、秋野和華子、野田衛: 食品のサポ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 36 回日本食品微生物学会学術総会、2015、川崎

3) 秋野和華子、斎藤博之、野田衛: 食品のウイルス検査における偽陽性防止対策に関する検討、第 36 回日本食品微生物学会学術総会、2015、川崎

4) Hiroyuki Saito, Wakako Akino, Mamoru Noda : Optimization of

RT-PCR to detect Sapovirus RNA recovered by PANtrap method. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会、2015、福岡

5) 斎藤博之、秋野和華子、田中智之、野田衛: 食品検体の病原ウイルス検査にパンソルビン・トラップ法を用いる際の捕捉抗体供給源に関する検討、第 110 回日本食品衛生学会学術講演会、2015、京都

6) 斎藤博之、秋野和華子、野田衛: LNA (Locked Nucleic Acid)修飾プライマーを用いたサポウイルス RNA 検出系の最適化、秋田応用生命科学研究会第 26 回講演会、2015、秋田

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

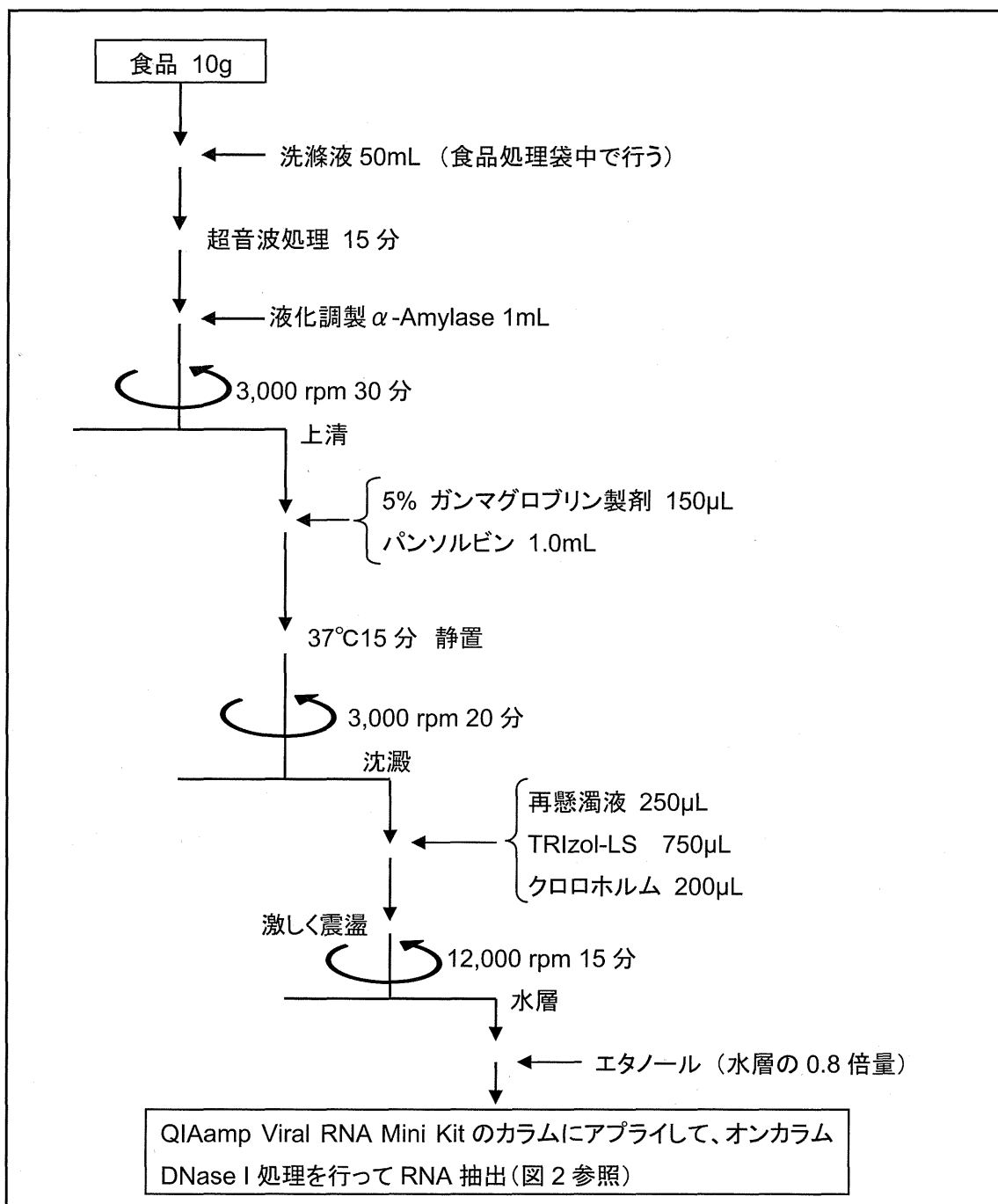


図1 パンソルビン・トラップ法の操作手順

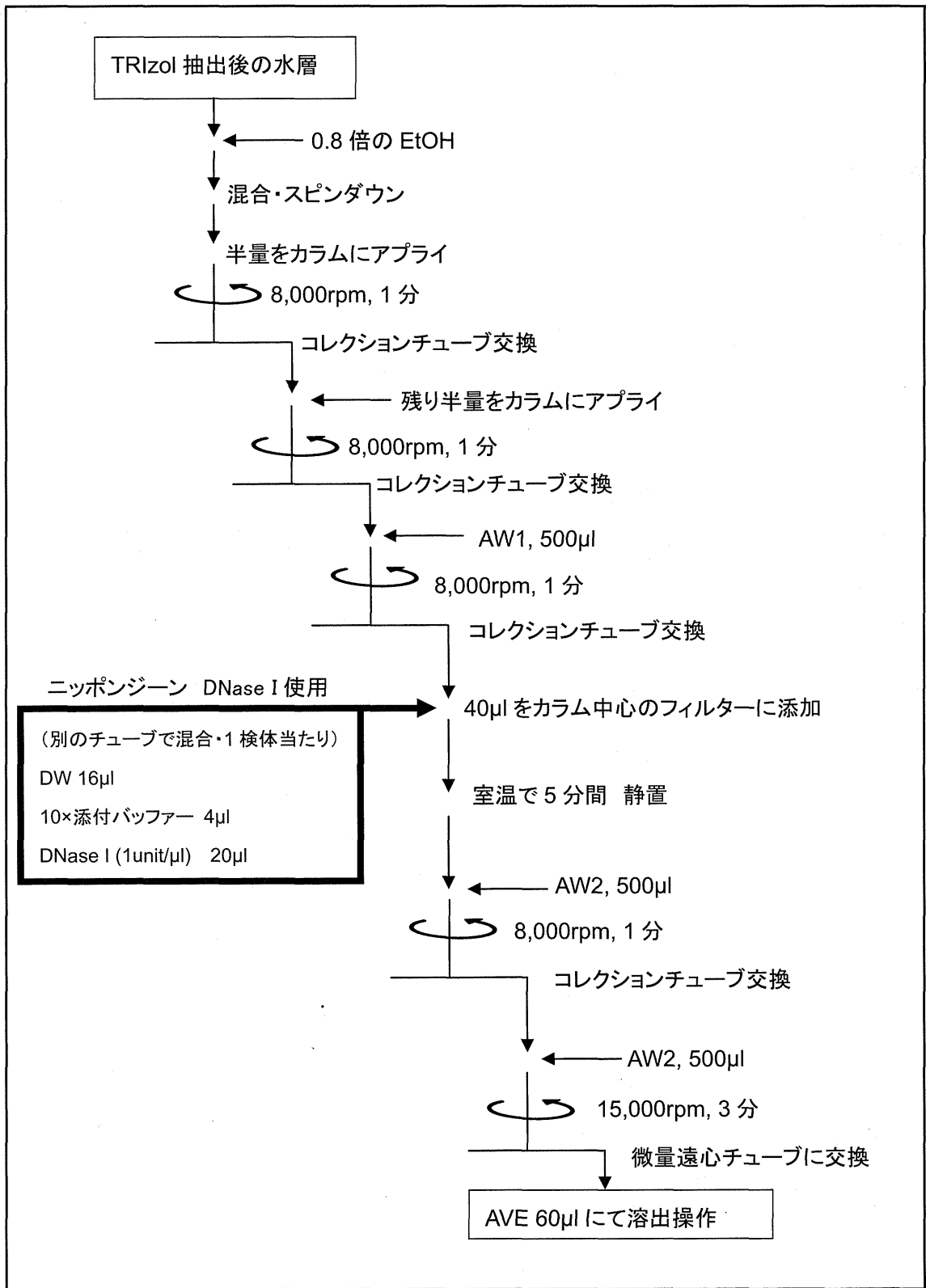


図 2 QIAamp Viral RNA Mini Kit へのオンカラム DNase I 処理

表 1 SaV の 1st. PCR 用プライマーの配列と Tm 値

使用目的	名称	塩基配列 (5'→3')	Tm 値 (°C)
Forward	SaV124F	GAYCASGCTCTCGCYACCTAC	65~69
	SaV1F	TTGGCCCTCGCCACCTAC	67
	SaV5F	TTTGAACAAGCTGTGGCATGCTAC	66
Reverse	R13	GGTGANAYNCCATTKTCCAT	56~65
	R14	GGTGAGMMYCCATTCTCCAT	59~67
Reverse	R13-L5	<u>G</u> <u>G</u> T <u>G</u> ANAYN <u>C</u> <u>C</u> AT <u>T</u> KTCCAT	66~77
	R14-L4	<u>G</u> <u>G</u> T <u>G</u> AGMMY <u>C</u> <u>C</u> AT <u>T</u> CTCCAT	66~74

G, C, T: LNA 修飾

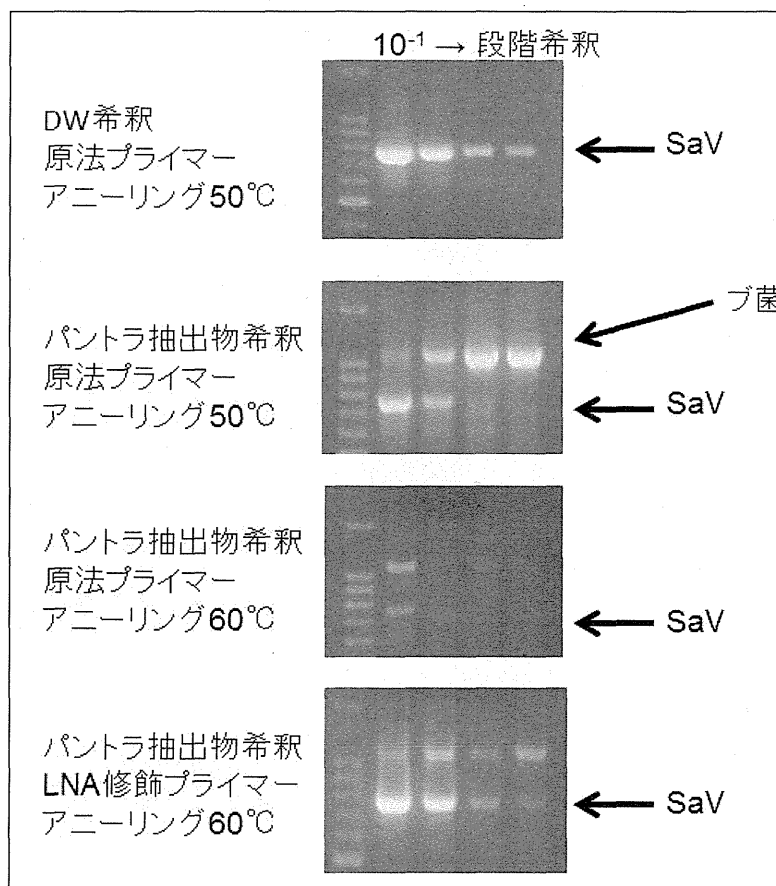


図 3 SaV の 1st. PCR における LNA 修飾プライマーの効果

5 × 10<sup>5</sup> コピー/μL の cDNA を段階希釈したものを 5 μL 投入 (25 μL 反応系)。

表 2 SaV の 2nd. PCR 用プライマーの配列と Tm 値

使用目的	名称	塩基配列 (5'→3')	Tm 値 (°C)
Forward	SaV1245Rfwd	TAGTGTTTGARATGGAGGG	57~59
Reverse	R2	GWGGGRTCAACMCCWGGTGG	65~70
Forward	SaV1245Rfwd-L3	T <u>G</u> T <u>G</u> TTT <u>G</u> ARATGGAGGG	63~64

G: LNA 修飾

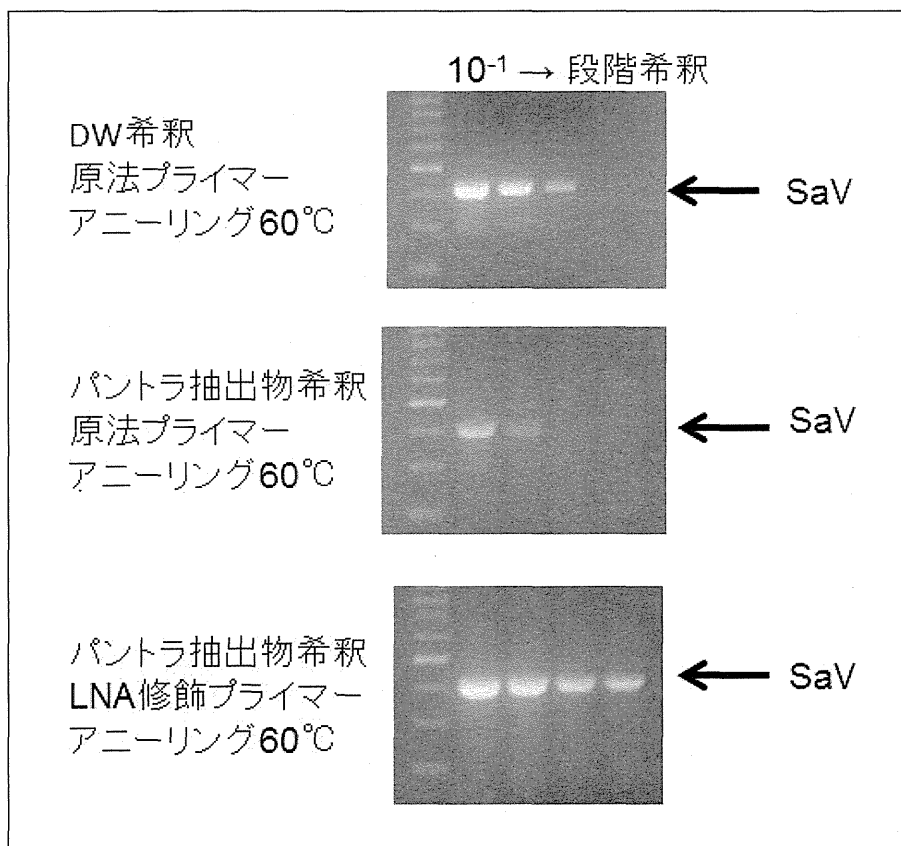


図 4 SaV の 2nd. PCR における LNA 修飾プライマーの効果

5×10<sup>3</sup>コピー/μL の cDNA を段階希釈したものを 5 μL 投入 (25 μL 反応系)。

表 3 SaV の real-time PCR 用プライマー・プローブセットの配列と Tm 値

使用目的	名称	塩基配列 (5'→3')	Tm 値 (°C)
Forward	SaV124F	GAYCASGCTCTCGCYACCTAC	65~69
	SaV1F	TTGGCCCTCGCCACCTAC	67
	SaV5F	TTTGAACAAGCTGTGGCATGCTAC	66
Reverse	SaV1245R	CCCTCCATYTC <sup>C</sup> AAACACTA	57~59
Probe	SaV124TP	FAM-CCRCCTATRAACCA-TAMRA-MGB	*1
	SaV5TP	FAM-TGCCACCAATGTACCA-TAMRA-MGB	*2
Reverse	SaV1245R-L3	C <sup>C</sup> CCTC <sup>C</sup> ATYT <sup>C</sup> AAACACTA	65~66

<sup>C</sup>: LNA 修飾

\*1: オリゴ DNA の Tm 値は 47~55°Cだが、MGB 修飾により親和性を上昇させている。

\*2: オリゴ DNA の Tm 値は 58°Cだが、MGB 修飾により親和性を上昇させている。

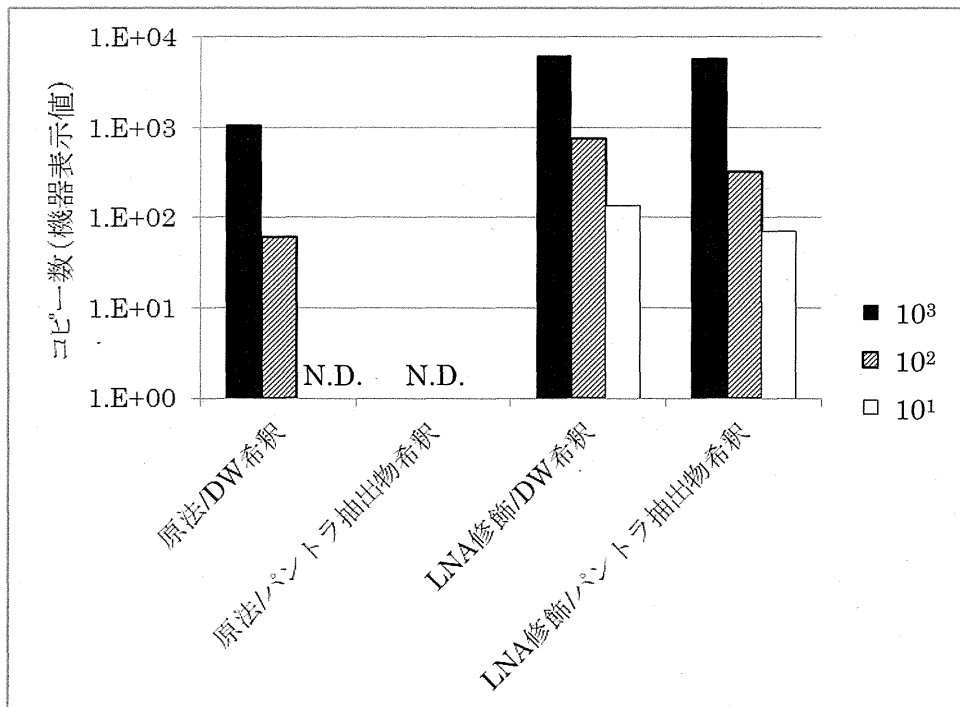


図 5 SaV の real-time PCR における LNA 修飾プライマーの効果

10<sup>1</sup>~10<sup>3</sup>コピーの cDNA を投入 (20 μL 反応系)。

N.D.: 不検出



表 4 SaV の逆転写反応専用プライマーの配列と Tm 値

名称	塩基配列 (5'→3')	Tm 値 (°C)	縮重度
PANR-SVa	G <u>C</u> VNYRA <u>A</u> RT <u>G</u> KT <u>G</u> RTTVACYTG	61~83	1536
PANR-SVb	GMR <u>T</u> TR <u>A</u> AR <u>T</u> G <u>K</u> C <u>K</u> R <u>T</u> TVACYTG	60~82	768
PANR-SVc	GYGGWRRRAATGGYGGTTRACYTG	61~73	128

A, G, C, T: LNA 修飾

PANR-SV: PANR-SVa, PANR-SVb, PANR-SVc を 6:3:1 で混合する

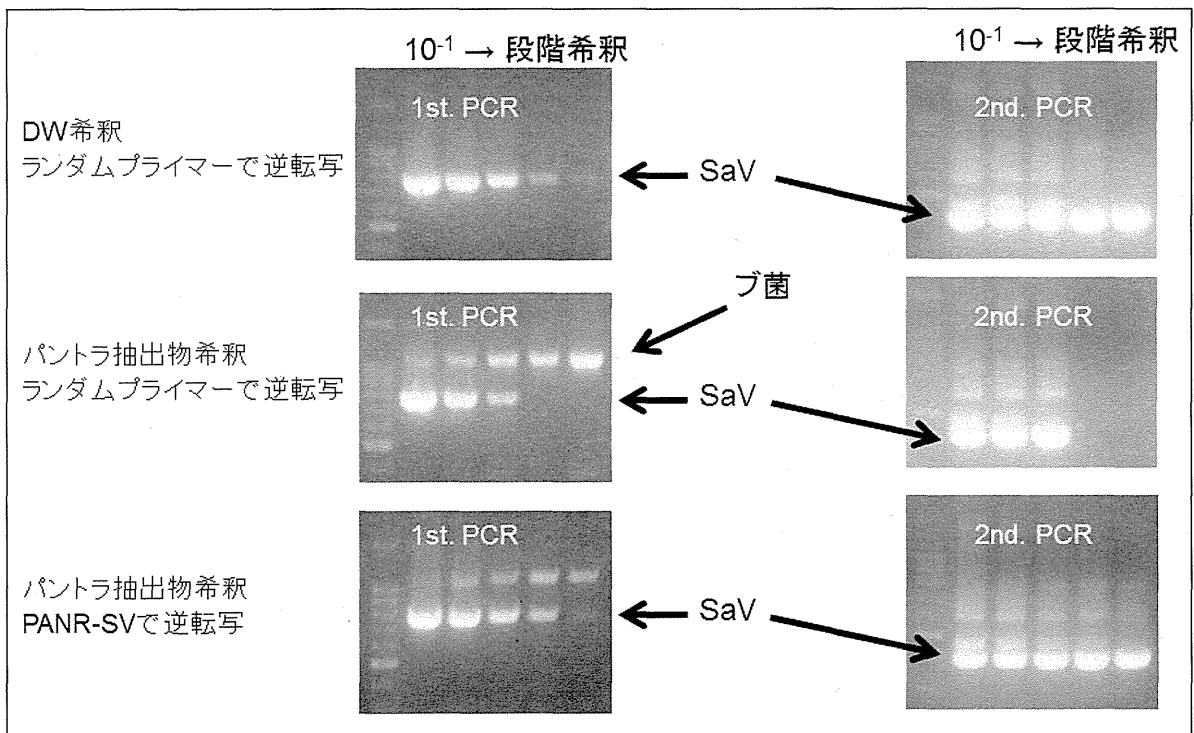


図 6 SaV の RT-PCR における逆転写反応専用プライマー(PANR-SV)の効果  
 $2 \times 10^6$  コピー/ $\mu$ L の RNA を段階希釈したものを逆転写反応の後、RT-PCR で増幅した。

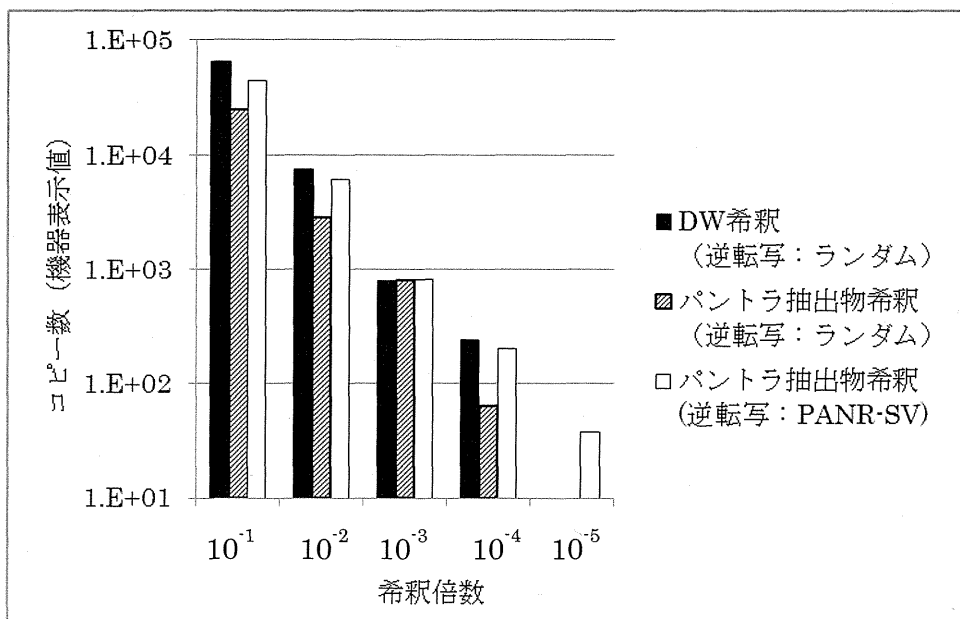


図7 SaVの Real-time PCR における逆転写反応専用プライマー(PANR-SV)の効果  
 $2 \times 10^6$ コピー/ $\mu$ LのRNAを段階希釈したものを逆転写反応の後、real-time PCRで定量した。

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

研究分担者	滝澤 剛則	富山県衛生研究所
研究協力者	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	長谷川 澄代	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、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 NoV GII. 17、NoV GII. 4 が順に多く検出された。NoV 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 NoV GII. 4 が最も多く検出された。NoV 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 NoV 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 NoV 遺伝子型のほか、SaV 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反映していると考えられた。

A. 研究目的

2015 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、それらの因

果関係が不明な事例がみられる。しかしながら、通常行っているダイレクトシーケンスでは主要な遺伝子型しか検出できない。そこで、昨年度に引き続き、そのような検体を次世代シーケンサー (NGS) を用いて遺伝子解析することで、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. 2015年の患者検体

富山県において2015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。

糞便検体の10%乳剤上清から、厚生労働省通知（食安監発1105001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、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G1-SKF/G1-SKR、G2-SKF/G2-SKRもしくは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の部分を用いて、Norovirus Genotyping Tool（URL: <http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool>）により行い、遺伝子型番号は、新しい遺伝子型分類法（国立感染症研究所, IASR 病原微生物検出情報, 35(7), 173-175, 2014）により表記した。SaVの型別判定には基準配列を用いた近接接合法による系統樹解析を行った。

### 2. 下水流入水

県西部に位置する下水処理場において、2015年1月から12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した後、細切した陰電荷膜を3% beef extract液10mlに浸漬し、Vortex処理により吸着分子を溶出した。溶出液を遠心し、回収した上清を100倍濃縮下水検体とした。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. 胃腸炎集団発生事例のNGSによる解析

富山県において2010年度から2012年度にかけて発生したNoVによる胃腸炎集団発生事例のうち、複数の遺伝子型の重複感染が疑われる2事例（事例番号1、2）及びカキ喫食事例3事例（事例番号3～5）を対象とした（表4）。各事例1～7検体、計20検体の10%便検体よりキャリアフリーの抽出液を用いてRNA抽出を行い、ScriptSeq v2 RNA-Seq Library Preparation kit（Epicentre）を用いてRNA-Seqライブラリを作製した後、NGS（MiSeq; Illumina）により、MiSeq Reagent Kit v2（500 cycle）またはMiSeq Reagent Kit Micro v2（300 cycle）またはMiSeq Reagent Kit v3（150 cycle）を用いて（表5）塩基配列を解読した。

解読結果は、国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センターのMetagenomic Pathogen Identification for Clinical