

1105001号)に基づき、RNA抽出、リアルタイムPCR法によるNoV遺伝子増幅を行い、各破碎条件でのNoV遺伝子検出率を比較した。

今回の検討では、リアルタイムPCR測定で増幅曲線がCt値を超えた検体をNoV遺伝子検出と判定した。

3. 方法2 抽出液の検討と酵素処理

方法1で抽出効果が最も高かった破碎条件で、PBS (pH7.0, 和光純薬), PK液 (30units/mL, Roche) およびAM液 (6.3units/mL, 和光純薬) 各2mLを抽出液とし、中腸腺を破碎し、各酵素液については恒温水槽で振とう加温し酵素処理を加えた後、方法1と同様にRNA抽出、NoV遺伝子を測定し、それぞれの抽出液での検出率及び検出遺伝子数を比較した。

なお酵素反応条件は、PKは37°C1時間後60°C15分の加温、AMは37°C1時間とした。

さらに、酵素処理時間の短縮を目的として、AM液を使用し、反応時間を30分、15分とし、同様にNoV遺伝子を測定、検出遺伝子数を比較した。

(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. 結果1

DDWで抽出した場合、条件D (3,500rpm・15秒)での検出率が最も高く(60%)、低速・短時間で破碎した群ほど検出率が高い傾向を示した。(図1)

2. 結果2

DDW抽出で検出率が高かった条件C (4,500rpm・15秒)、条件D (3,500rpm・15秒)について、抽出液にPBS、PK液を用いた場合のNoV遺伝子検出率を比較した。どちらを用いた場合も、条件Cの検出率が高く、それぞれ67%、75%であった。条件Dでの検出率はDDW抽出とほぼ同程度であった(図2)。

3. 結果3

条件D(3,500rpm・15秒)で破碎後にPK液及びAM液の酵素処理を行い、それぞれの方法で検出されたNoV遺伝子数(GII群)を比較した結果、AM液を使用した方法が最も多い傾向を示した(図3)。また、AM液を使用した方法と他の方法についてMann-WhitneyのU検定を行ったところ、有意水準1%で差が認められた。

AM液を使用し、酵素処理時間の短縮について検討した結果、酵素処理時間の短縮に伴い、検出遺伝子数の顕著な減少が認められた(図4)。

D. 考察

破碎法で抽出液としてDDWを使用した場合は、従来法より低速・短時間の条件で処理した群のNoV遺伝子の検出率が高かった。これは、従来法では中腸腺組織がより細かく破碎され組織がRNA抽出カラムに詰まり、抽出に影響した可能性が推測された。今回の結果よりDDW抽出では、3500rpm・15秒での破碎が最適条件と考えられた。

一方、PK処理を加えた群では高速破碎条件での検出率が高かった。これは、

より細かく破碎することにより酵素処理の効果が高まり、さらにPKにより抽出を阻害する蛋白質の分解やヌクレアーゼ活性の失活などの可能性が推定された。

また、AM処理を行った場合、検出されたNoV遺伝子数は他の方法と比較し有意に高値を示した。カキからのNoV抽出の際にはグリコーゲンなどの多糖類が阻害物質として働くことが知られており、AMの作用でこれらが分解され、その結果、抽出阻害が抑制され、効果的にウイルスが抽出できたと考えられた。

AM処理での時間短縮を試みたが、処理時間の短縮に伴い、検出される遺伝子数の減少が認められ、酵素処理時間の短縮は困難であると考えられた。

E. 結論

今回の検討により、カキ中腸腺からのウイルス抽出時の最適な破碎条件の設

定と酵素処理の有効性を確認することができた。すなわち本研究では、AM液を使用しカキ中腸腺を4500rpm、15秒で細胞破碎後、37℃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確認された。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表

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

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

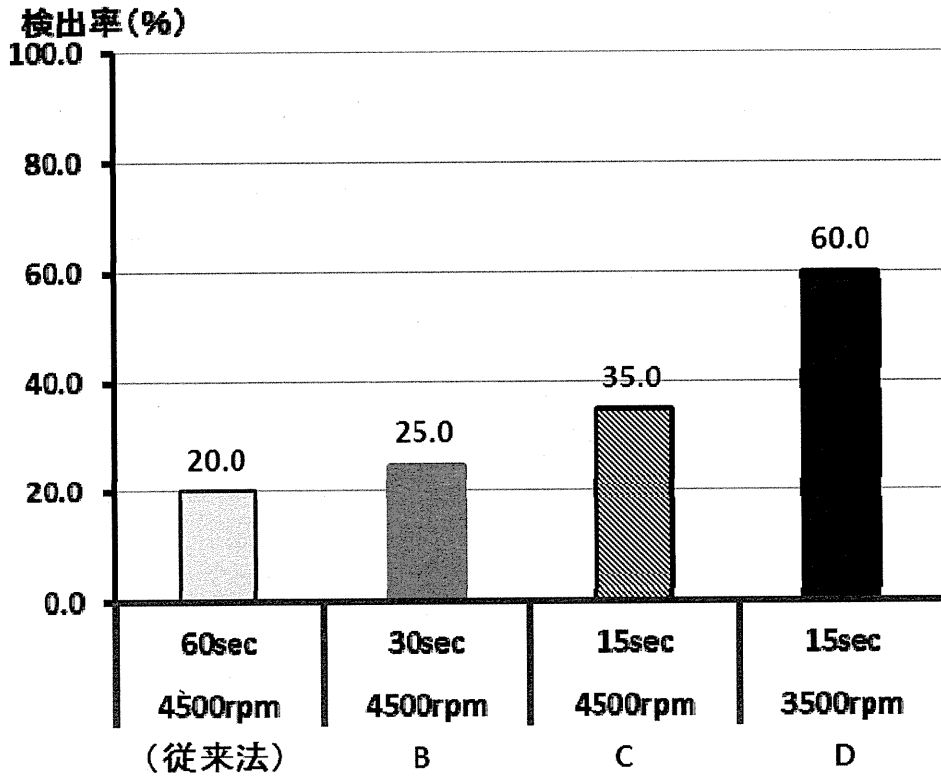


図1 破碎条件による遺伝子検出率の比較 (各群 n=20)

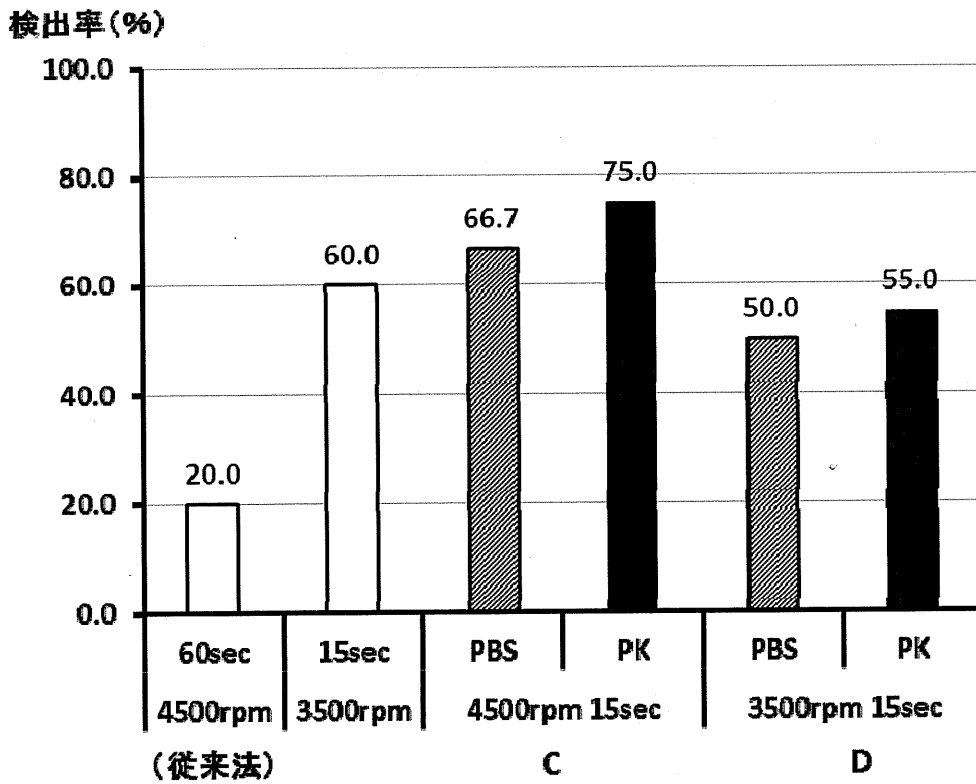


図2 破碎条件と抽出液の違いによる検出率 (各群 n=20)

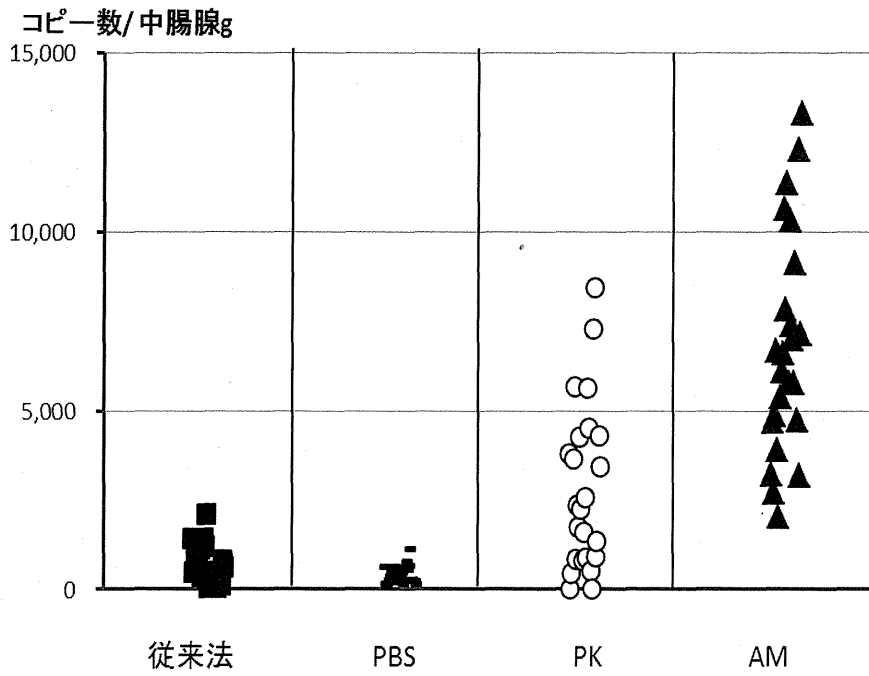


図3 抽出液による NoVG II 遺伝子数 (各群 n=24)

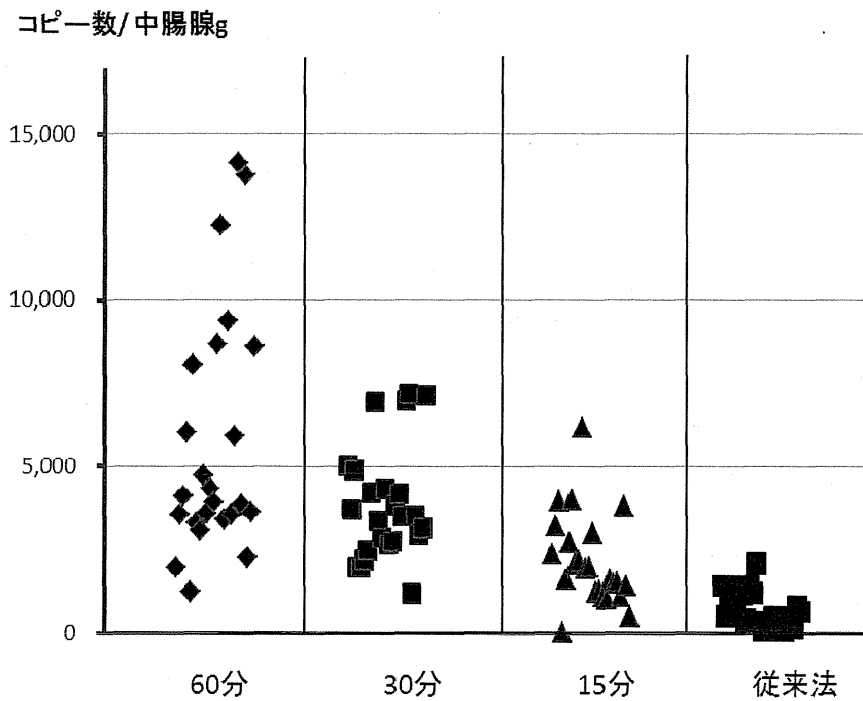


図4 α-Amylase 処理での処理時間と検出 NoVG II 遺伝子数 (各群 n=24)

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

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

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

2015 年 2 月に市販されていた生食用カキ 3 ロット、加熱用カキ 4 ロットの生カキを購入し、1 ロットあたり 3 検体抽出してノロウイルス、サポウイルス、アストロウイルス、アイチウイルス、A 型肝炎ウイルス、E 型肝炎ウイルスについて検索した。カキからのウイルスの検出には、カキの細胞由来の RNA が大量に存在するため、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場合が多い。そこで、①RT 反応と PCR 反応における特異性を重視した反応系の採用、②多種類の遺伝子型が混合している場合のシーケンス用プライマーを用いた遺伝子塩基配列の採取により、検索を行った。

その結果、GI ノロウイルスは 3 ロット 5 検体から、GII ノロウイルスは 6 ロット 13 検体から検出された。遺伝子型別では、GI は GI.2 : 4 検体、GI.4 : 1 検体、GII では、GII.17 : 8 検体、GII.4 2012 : 3 検体、GII.3 : 3 検体、GII.4 2006b : 3 検体、GII.6 : 2 検体となり、昨シーズンから流行が認められている GII.17 がカキから確認された。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であった。アイチウイルスは 2 ロット 5 検体から検出された。

GII ノロウイルス陽性で、複数の遺伝子型が混合したサンプルが 4 検体あったが、このサンプルからシーケンスプライマーを使用することで、塩基配列を採取することができた。食中毒検査の際は迅速性が求められることから、カキによる食中毒事例の検索の際の簡易法として活用できると考えられた。

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に困難となったりする場合も多かった。

そこで、非特異増幅を抑制する方法として、食品中のノロウイルスの検査法で使用されている高温で特異的プライマーを使用した逆転写反応や特異性の高い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DNA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、遺伝子型に特有の配列をもつシーケンス用プライマーを作成して、ダイレクトシーケンスで塩基配列データを得る方法を検討した。今年度は、GII.17、GII.3のシーケンスプライマーを追加した。

これらの検討を行いながら、2015年2月に市販の生カキにおいて、ノロウイルス等の胃腸炎ウイルス及びA型及びE型の肝炎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、2015年2月に購入した生食用C県産1ロット、D県産2ロット、加熱用A県産2ロット、F県産2ロット合計7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個を1検体として、1ロットあたり3検体を供試した。中腸腺の重量は1.3gから3.7gで、平均2.5gであった。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. 抽出核酸の逆転写反応

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 $^{\circ}$ C30分、85 $^{\circ}$ C5分の反応条件とした。

その他のウイルスについては、以下のリバープライマーを逆転写用のプライマーとした。サポウイルス：SV R13・SV R14、アストロウイルス：AC230、アイチウイルス：C-、A型肝炎ウイルス：1R-A、E型肝炎ウイルス：HEV R2。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 $^{\circ}$ C30分、85 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C1分、5サイクルの95 $^{\circ}$ C30秒55 $^{\circ}$ C \rightarrow 50 $^{\circ}$ 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°C7 分の反応を実施した。

2nd PCR 反応には、Takara Ex Taq HS(Takara)、あるいは Apta TaqFast PCR Master 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。

サポウイルスは Kitajima らの方法(App. Environ. Microbial., 76: 2461-2467, 2010)、アストロウイルスは Sakon らの方法(J. Med. Virol., 61: 125-131, 2000)、アイチウイルスは Yamashita らの方法(J. Clin. Microbiol. 38:2955-2961, 2000)、A 型肝炎は野田らの方法(平成 23 年度総括・分担研究報告所「食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究」)、E 型肝炎ウイルスは国立感染症研究所病原体検出マニュアルの方法に記載のプライマーを使用し、アニーリング温度はそれぞれのプライマーの設定温度にして実施した。

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、ABI3500 遺伝子解析装置 (ABI) により取得した。

MEGA5.02 により得られたデータの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

2014-15 シーズンには、GII.17 の遺伝子型のノロウイルスの流行が確認されており、この型がカキに含まれている可能性が高いことから、GII.17 を含む表 1 のシーケンス用プライマーによるダイレクトシーケンス法により、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。

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

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。RT 反応はコンベンショナル PCR の Transcriptor による逆転写サンプルを使用せず、プライマーに Random Primer と Oligo dt を用いた Highcapacity RNA-to-cDNA Kit (ABI) を使用し、リアルタイム PCR 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。

(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、加熱用のカキ 4 ロット中 3 ロット 5 検体から検出された。遺伝子型は、GI. 2 が 4 検体、GI. 4 が 1 検体であった(表 3、図 2)。

GII ノロウイルスは、生食用のカキ 3 ロット中 2 ロット 3 検体、加熱用のカキ 4 ロット 12 検体中 10 検体から検出された。PCR で用いたプライマー、G2SKF と G2SKR を用いたダイレクトシーケンス法による塩基配列の採取では、13 検体中 4 検体は Electropherogram の波形が混合して塩基配列を判別できなかった。

シーケンスプライマーにより得られたデータの一部を図 1 に示す。シーケンス用プライマーを用いることで、4 検体の混合サンプルから、GII. 17、GII. 3、GII. 4 Sydney 2012、GII. 4 2006b、GII. 6 の塩基配列が採取された。しかし、1 検体の混合波形サンプルでは、GII. 17 のみの採取となり、混合しているほかの塩基配列を採取できなかった。これらの混合波形からの検出を含めると、検出された遺伝子型は、生食用カキの 3 検体では GII. 3 : 1 検体、GII. 17 : 2 検体、加熱用カキ 10 検体から、GII. 17 : 6 検体、GII. 4 Sydney 2012 : 4 検体、GII. 3 : 2 検体、GII. 4 2006b : 2 検体、GII. 6 : 2 検体合計 19 の塩基配列が採取・遺伝子型別できた(図 2)。

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

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、検出されなかった。

アイチウイルスは、加熱用の 2 ロット 5 検体から検出され、ジェノタイプ A が 4 検体から、ジェノタイプ B が 1 検体から検出された(図 3)。

3. 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、加熱用の 4 ロット 6 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、生食用では 2 ロット 2 検体で増幅がみられたが、実測コピー数が定量下限の 10 コピーを下回り、陰性と判定された。加熱用では、4 ロット 10 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 7 検体は陰性と判定され、陽性と判定されたのは 1 ロット 3 検体のみであった。

生食用カキのほうが、加熱用カキより GII ノロウイルスの検出数、定量値とも低かった。

D. 考察

コンベンショナル PCR 法による胃腸炎ウイルスの検出では、特異性を高めるため、配列特異プライマーと Transcriptase 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、非特異バンドが少ない増幅が可能であった。

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が、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培養作業が必要で、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。

昨年度に引き続き、塩基配列特異的なシーケンスプライマーを用いたダイレクトシーケンスにより、Qualityの高いデータではないが、混合波形のサンプルから配列情報を得ることができた。特に、昨シーズンから流行している GII.17 は A 県産のカキのみ陽性で、F 県産のカキからは検出されず、F 県の産地では昨シーズン GII.17 の流行は低調であったことが推察された。

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成してデータを採取することで、食中毒事件の際のカキの検体からの遺伝子の検出には、迅速で有効な方法であると考えられる。

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。

GII ノロウイルスの増幅産物で、複数の遺伝子型が混合したサンプルから、シーケンス用プライマーにより、遺伝子塩基配列を得ることができた。迅速な対応が必要な食中毒検査の際に活用できる。

GI、GII ノロウイルス以外にも、アイチ

ウイルスが検出され、多様なウイルスの存在が確認できた。

ノロウイルス胃腸炎流行時の生カキのノロウイルスの汚染リスクは高く、販売、調理、喫食時には汚染リスクを十分考慮する必要がある。

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

表1 シーケンス用プライマー

対象遺伝子型	プライマー名	配列	備考
GII.4用	G2-4 F seq	tog caa tct ggc tcc cag ttt t	COG2F/G2SKR増幅産物用
	G2-4 R seq	taa cca ttg tac att ctg gcc aaa	G2SKF/G2SKR増幅産物用
	G2-4 F2 seq	caa ccc atc tga tgg gtc cg	"
	G2-4 R2 seq	gcc caa ggg cgc gct cca	"
GII.6用	G2-6 F seq	tog caa tct tgc tcc cga gg	"
	G2-6 R seq	ccc att ata cat acg gga cag g	"
GII.3用	G2-3 F seq	cat cta atg atg gtg ccg c	"
	G2-3 R seq	cct gca taa cca tta tac att cta	"
GII.17用	G2-17 F seq	gcc gct cca tct aat gat gg	"
	G2-17 R seq	tat aca tcc ttg aca aat gag cc	"

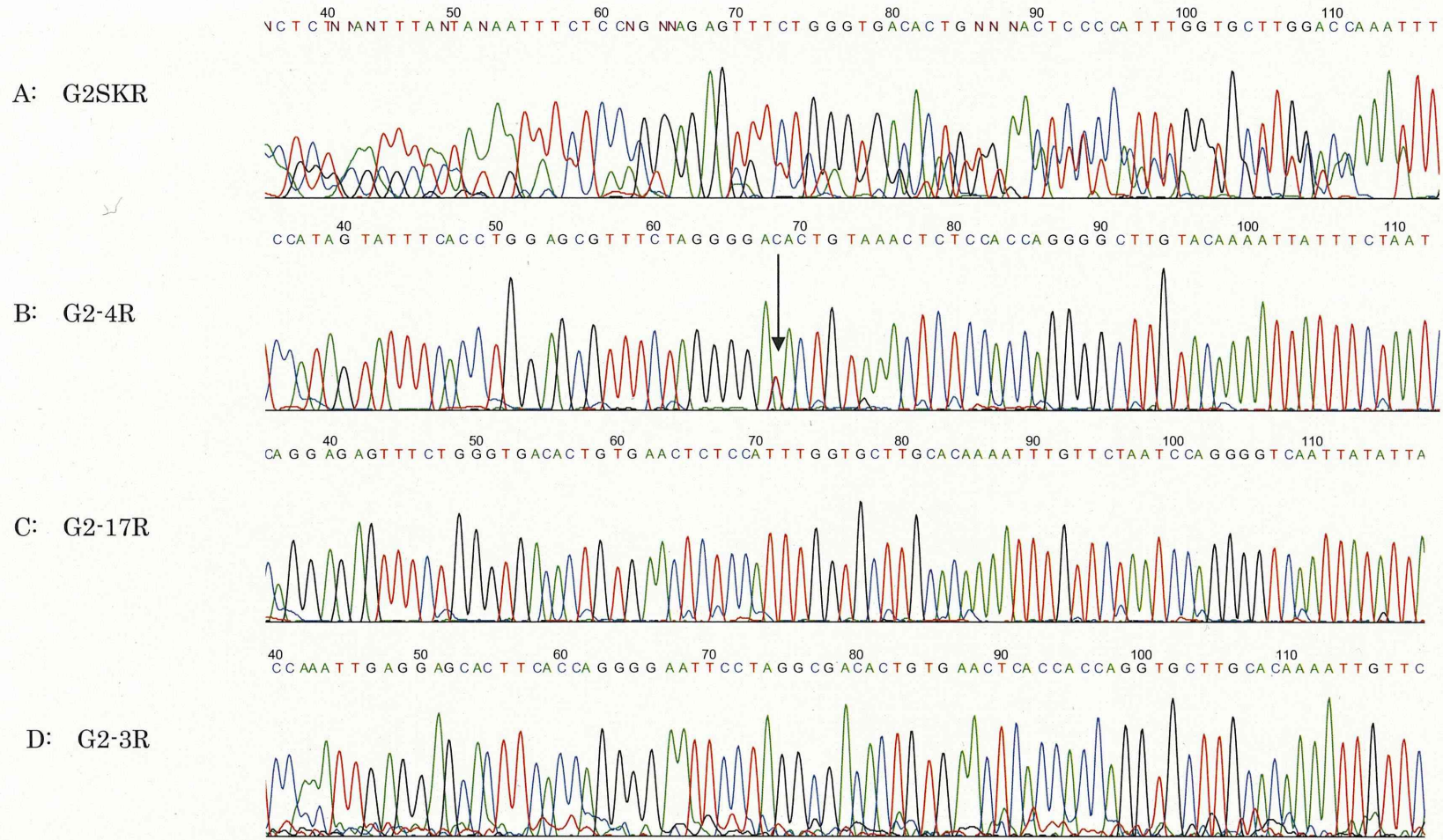


図1 混合波形のサンプルからのシーケンスプライマーによる Electropherogram の採取
※最上段 A は、2nd PCR で使用したリバープライマーにより採取した Electropherogram。B から C は、A と同じ精製サンプルから、G2-4R、G2-17R、G2-3R のシーケンスプライマーで採取したもの。A の波形の矢印は 1 塩基の混合部位。

表2 ノロウイルスのリアルタイム PCR による検出状況

ロット 番号	産地	加熱/生食 区分	検体 番号	中腸腺(g)	Norovirus G1				Norovirus GII			
					実測コピー 数	陽性・ 陰性判定	中腸腺1個あ たりコピー数	中腸腺 1gあたりの コピー数	実測コピー 数	陽性・ 陰性判定	中腸腺1個あ たりコピー数	中腸腺 1gあたりの コピー数
1	C	生食用	1-1	3.6								
			1-2	3.4								
			1-3	2.1								
2	D	生食用	2-1	2.8					0.51	陰性	129	46
			2-2	2.1								
			2-3	2								
3	D	生食用	3-1	1.9								
			3-2	2.6								
			3-3	2.2					0.54	陰性	99	45
4	A	加熱用	4-1	2.6	0.46	陰性	104	40	2.56	陰性	579	223
			4-2	2.7					2.20	陰性	510	189
			4-3	2.1					3.46	陰性	639	304
5	A	加熱用	5-1	1.6					40.05	陽性	5485	3428
			5-2	1.3					20.60	陽性	2223	1710
			5-3	1.9	0.80	陰性	128	68	22.75	陽性	3674	1934
6	F	加熱用	6-1	3.2	0.61	陰性	168	52				
			6-2	2.7	0.88	陰性	200	74	0.67	陰性	152	56
			6-3	2.8	0.13	陰性	29	10				
7	F	加熱用	7-1	2.8	0.21	陰性	49	18	1.31	陰性	312	111
			7-2	3.7					0.47	陰性	150	40
			7-3	2.2					2.60	陰性	498	226

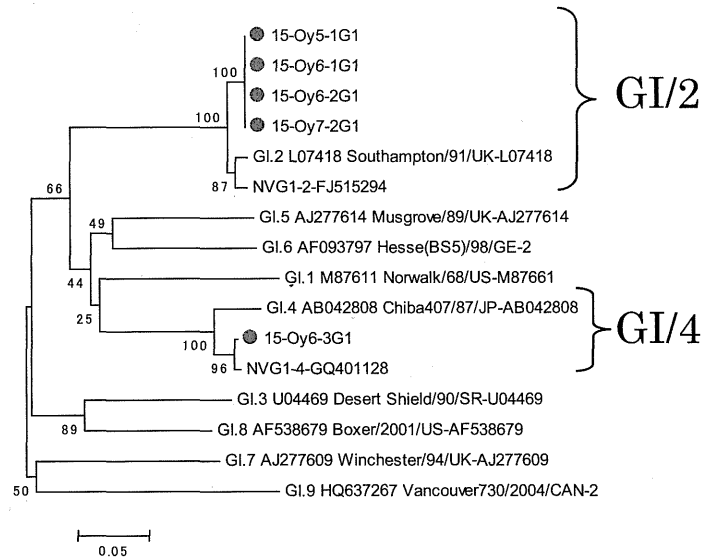
※空欄は陰性

表3 検出された胃腸炎ウイルスの遺伝子解析による型別結果

ロット 番号	産地	加熱/生食 区分	GI Norovirus	GII Norovirus				Aichivirus	
				PCRプライマーによ るシーケンス採取	シーケンスプライマーによる採取				
					G2-17F/R	G2-3F/R	G2-6F/R		G2-4F2/R2
1	C	生食用		GII.3					
2	D	生食用		GII.17 GII.17					
3	D	生食用							
4	A	加熱用		GII.17 GII.17 Mix	GII.17			B A	
5	A	加熱用	GI.2	Mix	GII.17	GII.3		GII.4 2006b A	
				Mix	GII.17		GII.6	GII.4 2006b A	
				Mix	GII.17	GII.3		GII.4 2012 A	
6	F	加熱用	GI.2	GII.6					
			GI.2	GII.4 2012					
			GI.4	GII.4 2012					
7	F	加熱用							
			GI.2						
				GII.4 2012					

“Mix” は Electropherogram 上で波形の混合がみられたサンプル

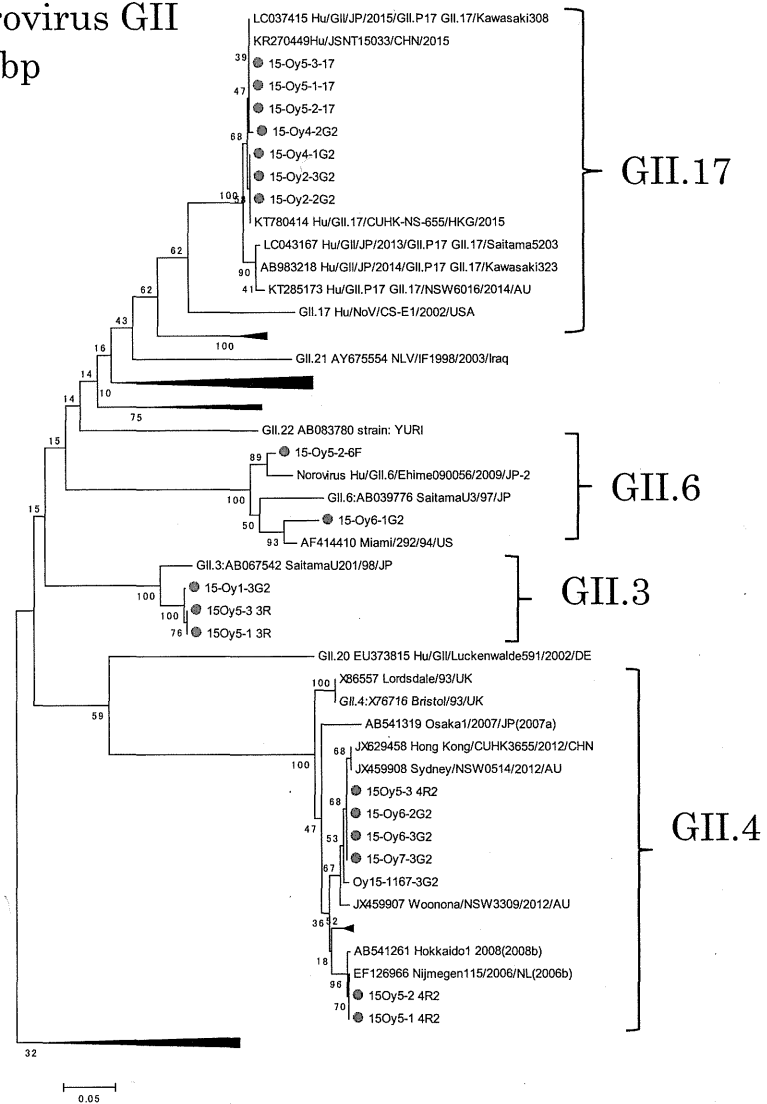
Norovirus GI
314bp



● : 2015年2月購入カギ検体

図2 ノロウイルスの塩基配列に基づく系統樹

Norovirus GII
263bp



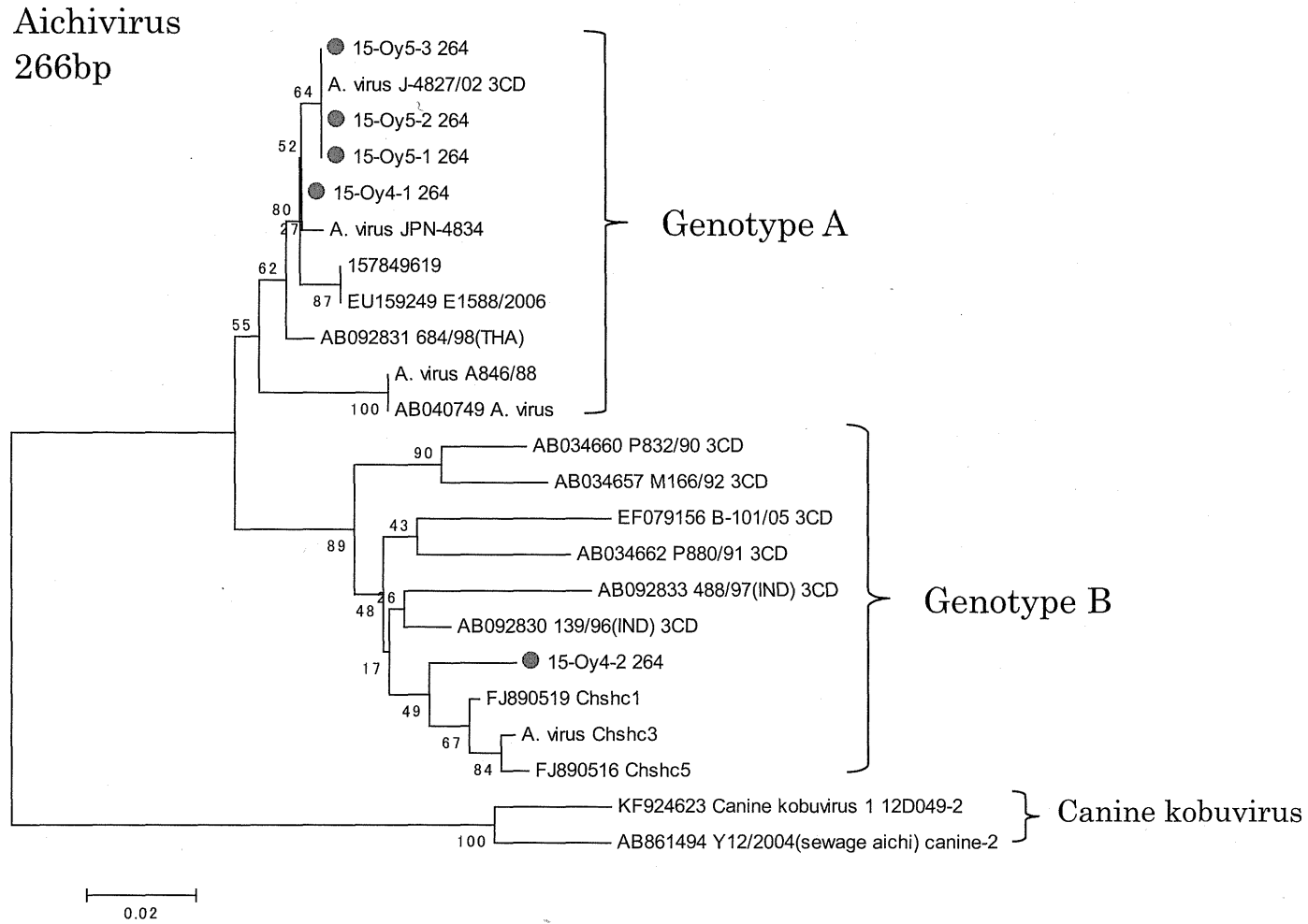


図3 アイチウイルスの塩基配列に基づく系統樹

● : 2015年2月購入カキ検体

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」

研究協力報告

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

研究協力者	森 功次	東京都健康安全研究センター
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	宗村 佳子	東京都健康安全研究センター
研究協力者	永野 美由紀	同 上
研究協力者	木本 佳那	同 上
研究協力者	秋場 哲哉	同 上

研究要旨

調理従事者の関与が推定される食中毒事例では、調理従事者糞便からノロウイルス(NoV)が検出される場合がある。ウイルスが検出された従事者については調理作業への従事の制限がもとめられるが、検出されたウイルスの感染性の有無についてはNoVの培養が一般的でないため不明である。そこで、NoV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。検討の結果、検出されたNoV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いことが確認できたことから、NoV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。

A. 研究目的

ノロウイルス(Norovirus: NoV)に起因する集団胃腸炎は多数発生しており、なかでも食中毒が疑われる集団事例においては、推定原因食品への関与が疑われる調理従事者からNoVが検出される場合がある。しかし、一般的にNoVは培養が困難なことから、調理従事者から検出されたウイルスの感染性の有無については

不明である。今回、感染性を持つウイルスの遺伝子量を推定する方法を用い、発症者と調理従事者における感染性粒子量の比較を試みた。

B. 研究方法

1. 材料

NoVが検出された5事例の集団胃腸炎事例由来の発症者50件および調理従事者17

件の糞便を供試材料とした。

2. 方法

検討は感染性粒子推定遺伝子検査法(野田ら)にもとづき実施した。すなわち供試材料の乳剤 70 μ L を RNase により 37°C、1 時間処理ののちウイルス RNA 抽出および DNase 処理を実施し、Oligo(dT) primer による逆転写反応後に real-time PCR によりウイルス量を定量した。同時に対照試験として RNase 処理なしでウイルス RNA 抽出および DNase 処理を実施し、Random primer による逆転写反応後に real-time PCR 法によりウイルス量を定量した。各試料に添加したネコカリシウイルス (Feline Calicivirus : FCV) の検出値をもとに測定値を補正し、各試料における定量値の比を求めて発症者および調理従事者について比較を行った。

(倫理面への配慮)

本研究の検討内容については、当センターの倫理審査委員会において審査済みである。

C. 研究結果

1. 感染性粒子推定遺伝子検査法による測定値の比較

感染性粒子の量と推定される測定値 (FCV による補正後) の平均値は、発症者で 4.9×10^4 (copies/ μ L)、調理従事者で 8.5×10^3 (copies/ μ L) であり、 $p=0.349$ と両群に有意差は認められなかった (図 2)。

2. 対照試験測定値における感染性粒子の比

対照試験値に対する感染性粒子の比は、発症者で平均 11.9、調理従事者で平均 13.1

であり、 $p=0.756$ と有意差は認められなかった (図 3)。

D. 考察

食中毒事例において、調理従事者の関与が推定される事例は、例年大きな割合を占めるようになっている。ウイルスを保有する調理従事者の存在は、加熱調理後の工程や施設の汚染により、推定原因食品が多岐にわたる可能性がある。今回の検討により、検出された NoV 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いことが確認できたことから、NoV の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。

E. 結論

検出された NoV 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いことが確認できた。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

・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

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

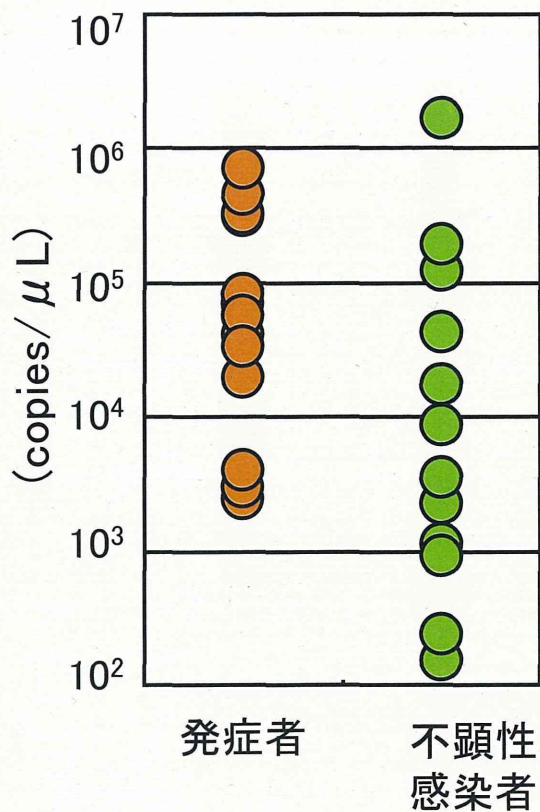
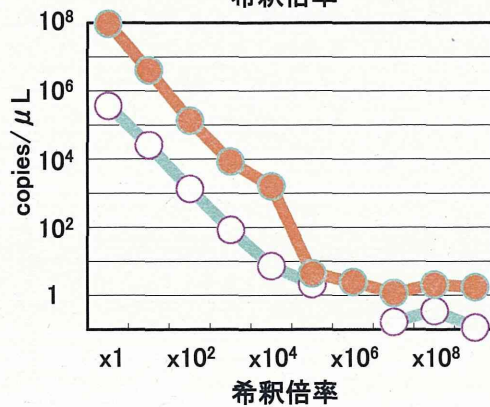
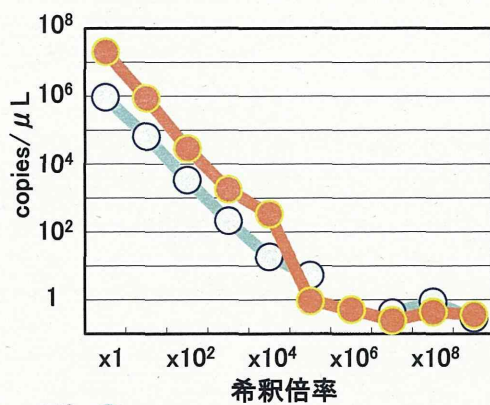
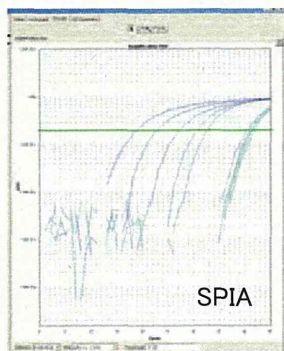
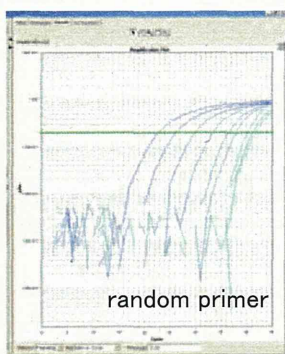


図1: 発症者および不顕性感染者における糞便中サポウイルス排出量の比較



— SPIA
— random primer

— SPIA
— random primer
RNA1 μLあたり

図2: MNV培養上清を用いた比較

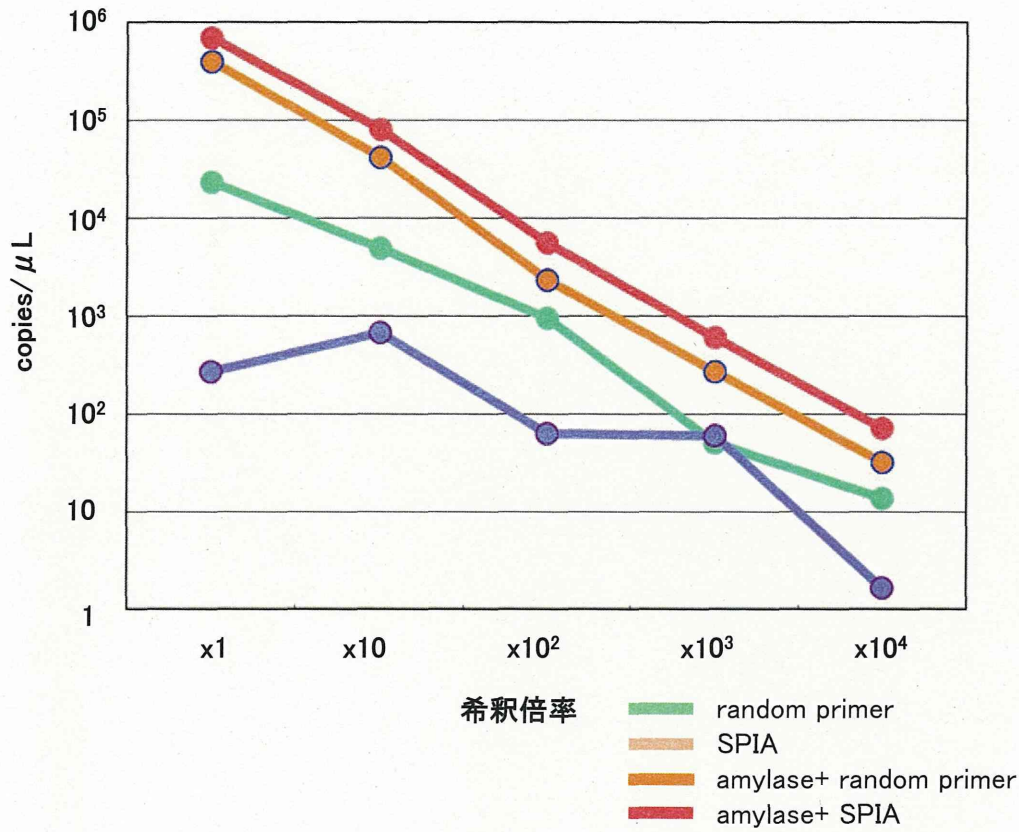


図3: カキ中腸腺乳剤に添加したMNV培養上清における検出値による補正後

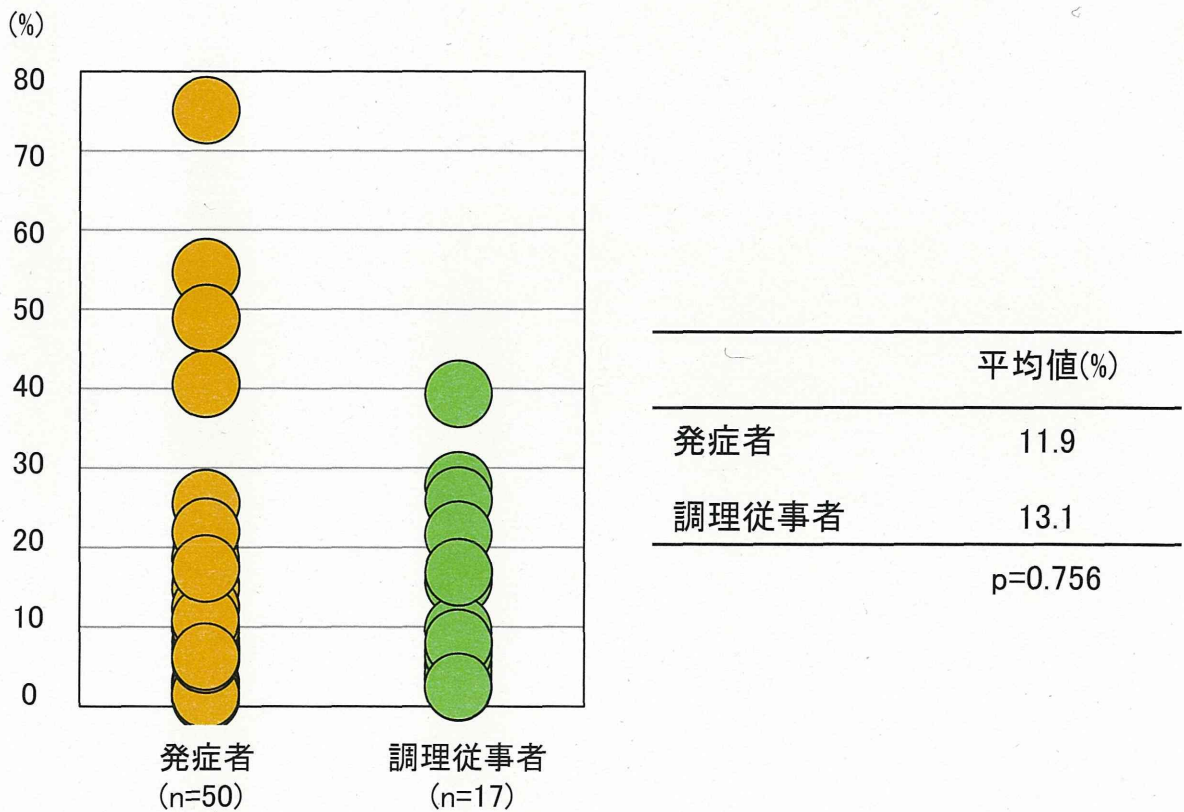


図4: 発症者と調理従事者における感染性粒子の比率