

201522012B

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25年度～27年度 総合研究報告書

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 25 年度～27 年度 総合研究報告書

研究代表者 野田 衛

平成 28 (2016) 年 3 月

## 目 次

### I. 総合研究報告

食品中の病原ウイルスの検出法に関する研究

野田 衛 ----- 3

#### (総合研究分担、研究協力報告)

1. パンソルビン・トラップ法による食品中の病原ウイルス検査の実用化  
齋藤 博之 他 ----- 29
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 ----- 51
3. ウイルスの食品検査の精度管理  
鈴木 達也 他 ----- 63
4. 食品から検出されるノロウイルス遺伝子の網羅的解析法の検討および  
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 ----- 75
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 ----- 95
6. 市販カキからの腸管系ウイルスの検出  
吉澄 志磨 他 ----- 113
7. 市販カキのノロウイルス等汚染実態調査  
筒井 理華 他 ----- 121
8. 市販カキからのノロウイルス等の検出状況  
佐藤 直人 他 ----- 129
9. 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 ----- 135
10. Nested real-time PCR を用いた市販カキからのノロウイルス検出と  
カキの前処理の高感度化の検討  
植木 洋 他 ----- 141
11. 2013年から2015年の感染性胃腸炎の流行期(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 ----- 145
12. ウイルス性胃腸炎の発生予防に関する検討  
森 功次 他 ----- 155
13. 愛知県における感染性胃腸炎患者からのノロウイルス検出状況  
(2012/13～2014/15 シーズン)  
小林 慎一 他 ----- 161
14. 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 -----	167
15.	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 -----	179
16.	2013-2015 年 2 月購入市販カキからのノロウイルス検出状況		
		重本 直樹 他 -----	187
17.	ハイドロキシアパタイトによるカキ及びふき取り検体からの ノロウイルス濃縮法の検討		
		谷澤 由枝 他 -----	193
18.	市販カキからの胃腸炎ウイルス検出状況		
		山本美和子 他 -----	199
19.	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 -----	207
20.	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 -----	217
21.	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, サポ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 -----	223
II.	研究成果の刊行に関する一覧	-----	243
III.	研究成果の刊行物・別刷	-----	257

## I 総合研究報告

平成 25～27 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・トラップ法の検査結果のばらつきの低減が図るとともに，工業用ガンマグロブリンの有効性を確認し，検査試薬の供給体制を確立した。また，サポウイルスの検出系の最適化を図ることができた。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。カキ由来ノロウイルスの 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。ノロウイルス検出検査に SPIA 法を導入することにより高感度化が図れるが，適切な前処理方法が必要である。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，発症者と調理従事者の間で差がなかった。ハイドロキシアパタイトを用いたノロウイルス濃縮法は，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。

#### (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

2013 年～2015 年の 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。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 等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。2012/13, 2013/14, 2014/15 シーズンとも、GII/. 4\_Sydney2012 が主流で、2014/15 シーズンはそれまで稀な GII. 17 が多く検出され、特にカキとの関連性が示唆された。検出株について、キメラウイルスの同定、系統樹解析を継続し、流行株の遺伝子変化についてデータを蓄積した。サポウイルス食中毒の発生要因はノロウイルスと同一であることが確認できた。変異株等の早期検出には、カキや下水等やヒトからのウイルス検出と遺伝子解析の継続が重要である。

### (3) 食品のウイルス検査の精度管理体制の確立

3 年間にわたり試行的にノロウイルスの定量検査の外部精度管理を実施した結果、定量値の変動要因として検量線作成用 cDNA 溶液が大きな影響を及ぼしていることが明らかとなった。また、検査方法等を限定することにより検査精度が高くなり、これを用いることで外部精度の実施が可能であると考えられた。ノロウイルス遺伝子検査に各機関で実際に使用している陽性コントロールに最大 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。A 型肝炎ウイルス、メンゴウイルス等のコントロール DNA を作製した。

<b>研究分担者</b>		名古屋 真弓	富山県衛生研究所
田中 智之	堺市衛生研究所	稲崎 倫子	同上
斎藤 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	吉澄 志磨	北海道立衛生研究所
	安全センター	筒井 理華	青森県環境保健センタ
渡辺 卓穂	同上		—
上間 匡	国立医薬品食品衛生研	武差 愛美	同上
	究所	坂 恭平	同上
		三上 稔之	同上
<b>研究協力者</b>		東海林 彰	同上
中阪 聡亮	一般財団法人食品薬品	古川 紗耶香	同上
	安全センター	佐藤 直人	岩手県環境保健研究セ
梅津 麻実	同上		ンター
秋野 和華子	秋田県健康環境センタ	高橋 雅輝	同上
	—	小野 泰司	同上

植木 洋	宮城県保健環境センター	八島 加八	同上
	—	石村 勝之	同上
木村 俊介	同上	山下 育孝	愛媛県立衛生環境研究所
菅原 直子	同上		所
田村 務	新潟県保健環境科学研究所	溝田 文美	同上
		吉富 秀亮	福岡県保健環境研究所
森 功次	東京都健康安全研究センター	芦塚 由紀	同上
		吉岡 健太	熊本県保健環境科学研究所
宗村 佳子	同上		
永野 美由紀	同上	原田 誠也	同上
木本 佳那	同上	西村 浩一	同上
林 志直	同上	飯塚 節子	島根県保健環境科学研究所
秋場 哲哉	同上		
小林 慎一	愛知県衛生研究所	三元 昌美	国立医薬品食品衛生研究所
入谷 展弘	大阪市立環境科学研究所		
		(順不同)	
山元 誠司	同上	<b>A. 研究目的</b>	
改田 厚	同上		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。
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		
田中 智之	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		
則常 浩太	同上		
藤井 慶樹	同上		

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・トラップ法の改良

パンソルビン・トラップ法において、結果がばらつく要因の洗い出しとその対応策について検討した。医療用ガンマグロブリンに代わる工業用ガンマグロブリンの有用性について検討した。サポウイルスの検査系の最適化を図った。

#### (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。

ノロウイルス陽性糞便検体から抽出した RNA を用いてノロウイルス遺伝子の網羅的解析法の検討を行った。また、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) ハイドロキシアパタイトによるカキ及びふき取り検体からのノロウイルス濃縮法の検討

ハイドロキシアパタイトを用いた濃縮方法のカキおよび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。

#### (6) ウイルス性胃腸炎検査への SPIA 法の導入の検討

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。

#### (7) Nested real-time PCR を用いた市販カキからのノロウイルス検出

2011 年 11 月～2015 年 3 月に購入した市販カキ 298 ロット 894 個体のうち通知法の定量 PCR 法により 10 コピー未満で増幅曲線が得られた検体について、nested real-time PCR 法で確認試験を行った。

#### (8) 食品媒介ウイルスの検査体制の強化と試験法の開発

厚生労働省通知法の他、ISO/TS 15216-1:2013、および研究班で開発した感染性推定遺伝子検査法の比較・検討を行うための陽性コントロールの作製を行った。また、A 型肝炎ウイルスの RT-PCR による検出について、研究班で開発したプライマーセットを用いて、サイバーグリーン検出系リアルタイム PCR の構築を

行った。

## 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

全国 11 地方衛生研究所の協力を得て、2013 年～2015 年の各 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。

養殖カキの筏の垂下距離によるノロウイルスの汚染率の違いを調べるとともに、養殖カキと下水から検出されたノロウイルスの遺伝子型を比較した。

### (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の散発例と集団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

食品のウイルス検査における検査精度の現状把握および精度管理手法の確立を

目的として、3年間にわたりノロウイルス検査を実施している検査機関を対象として、共通試料を配布することにより外部精度管理を試行的に実施し、その結果を分析した。

### (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。

### (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、厚生労働省通知法その他、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。

### (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) パンソルビン・トラップ法の改良

適切な逆転写酵素と PCR 酵素の選択、 $\alpha$ -アミラーゼ粉末の液化調製使用、DNase のオンカラム処理を導入することにより、検査結果のばらつきの低減が図れた。工業用ガンマグロブリンの有効性を確認するとともに、検査試薬の供給体制を確立した。サポウイルスの検出系に専用プライマーによる逆転写反応と LNA 修飾プライマーを導入することで、検査系の最適化を図ることができた。

(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)

糞便から直接抽出した RNA を次世代シーケンサーで解析したところ、ウイルスの精製に関わらず、圧倒的大多数が大腸菌あるいは宿主由来の RNA となりノロウイルスの検出は困難であった。また、RNA の断片化後、精製したものを用いても PCR 効率が悪く、RNA から直接ノロウイルスを検出する手法は実地試験として導入

しにくいと思われた。一方、ノロウイルス特異的 PCR 産物を用いた場合は、ノロウイルス (GII.4) のリードが得られた。

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た。

(上間研究分担報告)

### (3) ハイドロキシアパタイトによるカキ及びふき取り検体からのノロウイルス濃縮法の検討

ハイドロキシアパタイトを用いた濃縮方法において、カキからの回収率は低かったが、ふき取り及び再浮遊に 0.3% Zwittergent 加ダルベッコ PBS(-) を使用することで回収率が向上した

(谷澤研究協力報告)

### (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  $\alpha$ -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℃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)

#### (6) ウイルス性胃腸炎検査への SPIA 法の導入の検討

SPIA法を用いることにより検査の高感度化は図れたものの本反応が有効に作用するためには確実な前処理が必要となると思われた。

(森 研究協力報告)

#### (7) Nested real-time PCR を用いた市販カキからのノロウイルス検出

通知法のリアルタイム PCR 法の陽性基準以下(10 コピー未満)で増幅曲線が確認された 256 個体のうち、Nested real-time PCR 法により 73 個体 (28.5%) からノロウイルス遺伝子が検出された。

(木村研究協力報告)

#### (8) 食品媒介ウイルスの検査体制の強化と試験法の開発

A 型肝炎ウイルスの PCR 断片をクローニングし、さらに FLAG 配列を挿入することで臨床検体との区別が可能な陽性コントロールを作成した。ISO/TS 15216-1:2013 に記載されたメンゴウイルス検出リアルタイム PCR について、陽性コントロールプラスミドを作成した。メンゴウイルスのゲノム 3' 末端から約 2500 塩基程度の場所を標的にプラスミドを作成し、感染性推定遺伝子検査法にも対応可能とした。感染性推定遺伝子検査法の開発に用いているコクサッキーB5 型ウイ

ルスの陽性コントロールプラスミドも作製した。

(上間研究分担報告書)

## 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、2013 年～2015 年の各 2 月に加工された国産の市販生カキ 23 ロット (生食用 18, 加熱用 5) について検査した結果、加熱用カキの 83%, 生食用カキの 44% からノロウイルスが検出された。加熱用カキの陽性率は全体的に高く、生食用カキの陽性率はロット (採取海域) により大きく異なった。検出率が高かった遺伝子型は、2013 年が GII.4\_sydney2012、2014 年が GII.4\_sydney2012 及び GII.6、2015 年が GII.17, GII.4\_sydney2012, GII.3 であった。サポウイルスは 19 検体から検出されたが、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、2013 年～2015 年の各 2 月に購入した市販カキ 18 ロット 46 検体について検査した結果、生食用および加熱用カキ 15 検体からノロウイルス (GI.1, GI.3, GI.7, GII.3, GII.4, GII.4/2006b, GII.4/2012, GII.12, GII.13, GII.14, GII.17), サポウイルス (GI/1, GI/2) が検出された。

(筒井研究協力報告)

岩手県において、2014 年 2 月および 2015 年 2 月に購入した国産の市販カキ 13 ロット 72 検体について検査した結果、ノ



ロウイルス陽性はロット別で生食用 7 ロット中 4 ロット, 加熱用 6 ロット中 4 ロット, 検体別では生食用 37 検体中 5 検体, 加熱用 35 検体中 15 検体であった。遺伝子型別では GII.17 と GII.4\_Sydney2012 が多く検出された。サポウイルスは加熱用 1 ロット 1 検体から検出され, A 型および E 型肝炎ウイルスは検出されなかった。

(佐藤研究協力報告)

新潟県において, 2013 年~2015 年の 2 月に購入した生食用 8 ロット, 加熱用 11 ロット計 19 ロットの生カキについて検索した。リアルタイム PCR 法によるノロウイルスの定量では, GI 陽性検体は無く, GII は 57 検体中 15 検体が陽性と判定された。最大で GI は 472 コピー/g, GII は 3428 コピー/g で, GII の汚染量が多かった。コンベンショナル 2nd PCR では生食用カキでは GI38%, GII42%, 加熱用カキでは GI30%, GII91%から検出された。GII 複数型混合 PCR 増幅産物の 17 検体中 14 検体についてシークエンスプライマーを使用することで塩基配列を決定できた。サポウイルスが 5 検体, アストロウイルスが 9 検体, アイチウイルスが 13 検体から検出されたが, 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。

(田村研究協力報告)

大阪市において, 2012/13~2015/16 シーズンの期間に国内で市販されていた生カキ 31 ロットについて調査した結果, 生食用カキの 16.0%, 加熱調理用カキの 66.7%にノロウイルス汚染が認められた。サポウイルスは 12.0%の生食用カキに汚染が認められ, 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。

(入谷研究協力報告)

広島県において, 2013-2015 年の 2 月に購入した市販カキ中について調査した結果, 検出されたノロウイルス遺伝子型は GI では多様で, GII では特定の優勢な遺伝子型が検出される傾向があった。検出された遺伝子型はそのシーズンのヒトでの流行を反映していた。Nested PCR 法と Real-time PCR 法での結果が乖離するケースがあり, そのほとんどが Nested PCR 法が陽性, Real-time PCR 法が陰性であった。

(重本研究協力報告)

広島市において, 2013 年~2015 年の各 2 月に購入した市販カキについて調査した結果, 15 ロット 50 検体中 12 ロット 25 検体から, ノロウイルス, サポウイルス, アストロウイルスのいずれかが検出された。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。カキ及びヒトから検出されたノロウイルス遺伝子型は, シーズン毎に同様の傾向を示した。

(山本研究協力報告)

福岡県において, 2013 年, 2014 年および 2015 年のそれぞれ 2 月に県内で購入した 18 ロット 54 検体の市販カキについて検査した結果, 加熱調理用は 6 ロット中 6 ロット, 生食用は 12 ロット中 8 ロットからノロウイルスが検出された。中腸腺 1g 当たりの定量値は最大で 60, 861 コピーであった。

(吉富研究協力報告)

熊本県内において, 2014 年 2 月, 11 月及び 2015 年 2 月に採取された生食用及び加熱調理用生カキ 9 ロットのうち, 8 ロットからノロウイルスが検出された。遺伝

子量は、最小 894 コピー/g, 最大 28,669 コピー/g であり、遺伝子型は GII.4, GII.17 など計 11 種類に分類された。

(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

岩手県において、2013 年 10 月～2014 年 2 月 (13/14 シーズン) 及び 2014 年 10 月～2015 年 2 月 (14/15 シーズン) の 2 期間に、県内養殖カキ 120 件および養殖海域に隣接する下水処理施設で採取した流入水・放流水計 40 件を対象にノロウイルスの検出を試みた。その結果、13/14 シーズンは放流水から 12 月に 2 件、カキから 1～2 月に 6 件、14/15 シーズンはカキから 1 月以降 4 件、放流水からは 2 月に 1 件検出された。放流水とカキから検出された遺伝子型は複数検体で一致した。養殖カキの垂下 10m 層では 1 件、2m 層では 8 件から検出され、浅い層の検出率が高い傾向を示した。

(佐藤研究協力報告)

富山県において、2013～2015 年に胃腸炎患者、下水流入水、岩ガキからノロウイルス・サポウイルスの検出を試みたところ、患者および下水からノロウイルス GII.4 が最も多く検出された。GII.4 の亜型は Sydney 2012 が中心であった。ノロウイルスの GI, 特に GI.4, GI.6 は下水から多数検出されたものの患者からの検出は少なく、不顕性感染が多いと考えられた。岩ガキからノロウイルスが検出されたことで、生食による感染リスクが改めて示唆された。

(滝澤研究分担報告)

堺市において、下痢症ウイルスと A 型

肝炎ウイルスについて患者と下水検体を用いて流行状況を把握した。ノロウイルスの下水中の遺伝子量は冬季に増加し、臨床検体由来のほとんどの遺伝子型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。

(三好研究協力報告書)

福岡県において、2013 年 9 月から 2015 年 10 月までの期間に 2 処理場から採取した流下流入水計 52 検体を対象に調査した結果、ヒトでのノロウイルスの流行と一致し、例年 11 月頃から翌年 7 月頃まで  $10^6$  コピー/L を超えるノロウイルス遺伝子が検出された。

(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

東京都において、2013 年のサポウイルスによる事例を検討した結果、生カキの喫食歴がある事例、調理従事者の関与が推定される事例、および食品の関与が推定されない事例が含まれていた。発症者と不顕性感染者の糞便中に排出されるウイルス量を比較したところ、ノロウイルスと同様に両群に有意差が認められなかった。

(森研究協力報告)

愛知県において、2012 年 9 月から 2015 年 8 月の 3 シーズンにわたり散発性感染性胃腸炎患者から検出されたノロウイルスの分子疫学的解析を行った。胃腸炎患

者 302 検体からノロウイルスが検出され、GI 陽性が 10 検体 (3.3%)、GII 陽性が 292 検体 (96.7%) であった。主流遺伝子型は、3 シーズンをとおし GII.4 であったが、2014/15 シーズンには稀な GII.17 が散発的に検出された。2012/13 シーズン以後の 2 シーズンも GII.4\_Sydney2012 が優勢であった。

(小林研究協力報告)

大阪市において、2013 年 9 月から 2015 年 12 月までの 3 シーズンに 4 種類の遺伝子型 (GII.3, GII.4, GII.6 および GII.17) のノロウイルスが異なる時期に流行していたことが確認された。GII.4 以外の検出株は RNA-dependent RNA polymerase 領域が異なる遺伝子型のキメラウイルスであった。稀な遺伝子型である GII.17 は同時期に国内だけでなくアジアで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、2012 年 10 月～2015 年 12 月の間に、感染性胃腸炎患者から検出されたノロウイルス 307 例 (GI 53 例、GII 254 例) について遺伝子型別を行った。GI は 4 種類、GII は 9 種類の遺伝子型が確認された。検出 GI の約 60% を占めた GI.3 は 2015 年 6 月～8 月に多く検出された。GII で最も多かった GII.4 の大部分は Sydney2012 と近縁であった。2014 年 5 月～6 月に GII.6 の新しい変異株が多数検出された。GII.2 は GII.P16-GII.2, GII.3 は GII.P12-GII.3, GII.14 は GII.P7-GII.14 のキメラウイルスであった。GII.P17-GII.17/Kawasaki308 と高い相同性を示す GII.17 が 2015 年 2 月～4 月に検出された。

(山下研究協力報告)

熊本県において、2012/13 シーズンから 2014/15 シーズンに散発・集団発生事例から検出されたノロウイルスとサポウイルスの遺伝子解析を行ったところ、ノロウイルスは GI.3, GII.4, GII.7, GII.17 など計 11 種類、サポウイルスは GI.1, GI.2 など計 7 種類に分類された。

(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

平成 25 年度は検査方法を 2 種 (共通および各検査機関での実施方法) および検量線作成用 cDNA 溶液を 2 種 (配付した共通溶液および各検査機関で使用している溶液) として調査を行ったところ、検量線作成用 cDNA 溶液を共通とすることで、結果のばらつきが軽減された。また、共通の検査方法の結果のばらつきが小さかった。平成 26 年度は検査方法を共通の方法のみとし、検量線作製用 cDNA 溶液については平成 25 年度と同様とした。前年度と同様に検量線作成用 cDNA 溶液を共通とすることで標準 cDNA 溶液のばらつきは小さくなった。以上から結果の変動要因として検量線作成用 cDNA 溶液および検査方法が考えられたことから、平成 27 年度は検査方法の共通化、検量線作成用 cDNA 溶液の共通化、検査担当者の限定および 1 人あたりの検査検体数の増加を行い、調査を実施した。これにより明らかに標準 cDNA 溶液ではばらつきが小さくなり、糞便試料においても対数換算値を用いることで 1 オーダー以内のばらつきとなった。また、対数換算値を用いて  $z$ -スコアと

Xbar-R 管理図を併用することにより、検査結果と検査結果の繰り返し精度を同時に評価することが可能であった。

(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)

## (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、メングウイルス、コクサッキー B5 型ウイルスを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)

## 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・トラップ法の改良

パンソルビン・トラップ法における添加抗体の供給源として工業用ガンマグロブリン製剤を用いることで普及が容易となった。ノロウイルスとサポウイルスに対して RNA 検出系の最適化を行い、黄色ブドウ球菌遺伝子の影響を受けずに感度を維持できる反応条件を設定した。結果のばらつきの低減のため  $\alpha$ -Amylase の液

化調製法、DNaseI のオンカラム処理法を導入し、偽陽性対策として UNG 処理を導入した。これらの変更等により本試験法の改良を行うことができた。今後は、新たな食中毒起因ウイルスへの対応や、反応系のスケールアップ、及び回収率を評価するための内部標準の導入などが課題となる。

(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) ハイドロキシアパタイトによるカキ及びふき取り検体からのノロウイルス濃縮法の検討

ハイ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。

(谷澤研究協力報告)

### (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)

### (6) ウイルス性胃腸炎検査への SPIA 法の導入の検討

SPIA 法は反応阻害物質に大きく影響すると思われた。そのため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るが、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る。

(森研究協力報告)

### (7) Nested real-time PCR を用いた市販カキからのノロウイルス検出

通知法の Real-time PCR 法による検査では、現行基準に従った場合、偽陰性となることが少なくないことが示された。カキなど汚染量が少ない場合は、real-timePCR 法で増幅曲線が確認された際には、Nested real-time PCR 法などの二段階遺伝子増幅法による再検査が必要である。

(木村研究協力報告)

## 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

3年間にわたり各種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。その結果、多くのカキがノロウイルスに汚染していることが明らかとなった。また、加熱調理用カキの汚染率、汚染量が高く、汚染ウイルスの種類も多かった。生食用カキは特に産地で汚染率が大きく異なった。これらのことから流行期のカキには加熱調理用、生食用を問わずウイルスの汚染リスクがあると考えられる

(吉澄、筒井、佐藤、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も少なからずカキから検出された。カキによる健康被害発生時にはノロウイルスと同様に検査対象とする必要があると考えられる。

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。A 型肝炎は不顕性感染が多く、また潜伏期間が約 1 カ月と長期であり、感染源の特定や感染実態の把握をすることが一般的に困難な事例が多い。今回、下水から検出した A 型肝炎ウイルスは感染者糞便由来と推定され、下水中の A 型肝炎ウイルス遺伝子を解析することにより、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。

（三好研究協力報告）

富山県において、3 年間にわたる調査では、患者、下水両方においてノロウイルス GII. 4 の検出が最も多く、GII. 4 Sydney 2012 亜型が主流であった。GII. 17 は 2014 年以前には、2013 年 1 月の患者 1 例のみであったが、2015 年 3 月～5 月には患者、2015 年 4 月～12 月には下水から多く検出され、2015 年に入り県内でも流行が始まったと考えられた。GI は下水からのみ検出された型（GI. 3, GI. 5）や、下水から多く検出されたものの患者は少ない型（GI. 4, GI. 6）が存在し、これらは不顕性感染例が多いと考えられた。同時期に患者と下水の両方から検出された場合、互いに近縁であることが多く、下水が不顕性感染を含めた流行型の指標となりうることを示された。サポウイルスは小児散発例や下水から検出されることが多かった。2013 年 7 月には成人の集団感染事例が発生したことから、成人でのサポウイルス感染も注意する必要がある。

（稲崎研究分担報告書）

福岡県における下水調査から、流入水

中のノロウイルス調査はヒトでの流行状況を反映し、流行の指標となるデータを得られる有用な方法であると考えられた。

(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

東京都におけるサポウイルス検出事例の解析から、ノロウイルスと同様に小児から高齢者まで幅広い年齢層において発生し、同様に糞便中のサポウイルスは発症者群と非発症者の間に有意差がみられなかった。これらの結果からサポウイルスの感染要因はノロウイルスと同一であることが確認できた。

(森研究協力報告)

大阪市において、3シーズンのノロウイルス流行について分子疫学的解析を行ったところ、推定原因や主に流行していた年齢層に特徴が認められ、遺伝子型によって感染経路や流行する年齢層が異なることが示唆された。また、GII.4株以外の3種類の株はキメラウイルスであった。GII.3株については、新しい変異株の出現が流行規模に影響していたと考えられた。稀な遺伝子型であるGII.17については、国内だけでなくアジアで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、感染性胃腸炎の原因ウイルスの54.2%はノロウイルスであった。2015年6月～8月にGI.3が多数検出された。GIIでは、GII.4, GII.2, GII.3, GII.6, GII.17, GII.14の検出数が多かった。Sydney2012タイプは、2012/2013シーズンの全国流行以降、GII.4の主流になっていた。GII.6は2013/2014シーズンに

感染性胃腸炎から多く検出された。GII.2, GII.3, GII.14の株はキメラウイルスであった。GII.17が2015年2月～4月に集中して検出された。これらの株はGII.P17-GII.17/ Kawasaki308と高い相同性を示した。ノロウイルスは、遺伝子型内での変異や異なった遺伝子型間の組換えによる新しい変異株の出現等を繰り返しながら地域流行を起こしていることから、食中毒等集団発生の予防は変異株の継続的監視が必要である。

(山下研究協力報告書)

熊本県において、下痢症の散発・集団発生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、GI.3, GII.4, GII.7, GII.17など合計11種類の遺伝子型が検出された。各シーズンにおいて全国で検出割合の大きかった遺伝子型と一致しており、同シーズンに全国的に流行した遺伝子型が熊本県でも流行していたと考えられた。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

ノロウイルス検査において変動要因として検量線作成用cDNA溶液が大きな影響を及ぼしていることが明らかとなった。また、検査方法等を限定することにより検査精度が高くなり、これを用いることで外部精度管理調査の最大の目的である検査機関の評価を行うことが可能である

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、検査法の制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)

## (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)

## 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・トラップ法の検査結果のばらつきの低減が図れた。工業用ガンマグロブリンの有効性を確認し、検査試薬の供給体制を確立した。サポウイルスの検出系の最適化を図ることができた。

次世代シークエンサーを用いたメタゲノム解析では、ダイレクトシークエ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。

カキから従来法と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。

カキの前処理法である細胞破碎法において、アミラーゼ液を使用しカキ中腸腺を 4,500rpm, 15 秒で細胞破碎後、37°C1 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った。

SPIA 法で検査の高感度化は図れるものの本反応が有効に作用するためには確実な前処理が必要である。

ハイドロキシアパタイトを用いたノロウイルス濃縮法は、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。

### 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 11 自治体において 2013 年、2014 年及び 2015 年の 2 月を中心に採取された国産の市販生カキ等から、ノロウイルスが 75.4% (138/183), サポウイルスが 20% (130/148) から検出され、A 型肝炎ウイル