



表 6. NGS による解析を行った胃腸炎集団事例の概要

事例番号	発生時期	発生場所	推定感染源	検査数	ウイルス検出 検体数	ダイレクトシーケンス 検出ウイルス	ディープシー クエンス解析 検体数	メタゲノム 解析検体数
1	2011年10月	飲食店	食品(加熱力キ喫食)	2(患者2)	2(患者2)	NoV GII.12 2名 (1名は混合波形)	1	
2	2012年4月	飲食店	食品	45(患者14、従業員31)	22(患者14、従業員8)	NoV GII.14 20名 (患者13、従業員7) NoV GII.6 1名(従業員)	2	
3	2013年1月	葬祭場	不明	12(患者2、従業員10)	2(患者2)	NoV GI.4 1名 NoV GII.12 1名	1	
4	2012年2月	飲食店	食品	25(患者14、従業員11)	13(患者11、従業員2)	NoV GI.4 12名(患者11、 従業員1) NoV GII.12 1名(従業員)	1	7
5	2013年1月	飲食店	不明	4(従業員1、患者3)	4(従業員1、患者3)	NoV GII.17 1名 NoV GI.4 1名 NoV GI.4+GI.6 1名 NoV GII(リアルタイムPCR のみ陽性) 1名(従業員)		4
6	2010年4月	飲食店	食品(生岩ガキ喫食)	1(患者1)	1(患者1)	NoV GI.7 1名		1
7	2010年5月	飲食店	食品(生岩ガキ喫食)	11(患者8、従業員3)	7(患者7)	NoV GII.2 4名 NoV GI.4 2名 NoV GI.6 1名		1
8	2011年2月	飲食店	食品(生ガキ喫食)	10(患者7、従業員3)	6(患者6)	NoV GI.3 1名 NoV GII.14 3名 NoV GII型不明 1名 SaV GI.2 1名		7

表 7. ディープシーケンス解析により検出された胃腸炎ウイルス遺伝子の内訳

事例番号	検体番号	患者・従業員	NoV型別	
			ダイレクト シーケンス	ディープシーケンス解析 (リード数の多い順)
1	1	患者	GII.12(混合波形)	GII.12、GII.2、(GII.14、GII.4、GII.6)
2	2	患者	GII.14	GII.14、(GII.12、GII.6、GII.4、GII.2)
	3	従業員 (無症状)	GII.6	GII.6、(GII.12、GII.4、GII.14、GII.2)
3	4	患者	GII.4	GII.4、(GII.12、GII.6、GII.14、GII.2、GII.10)
4	5 <sup>(*)</sup>	従業員 (無症状)	GII.12	GII.12、GII.4、(GII.14、GII.6、GII.2、GII.7)

( ): 検出割合が0.1%未満の遺伝子型

(\*) : 表 8 検体番号 5 と同一検体

表 8. メタゲノム解析により検出された胃腸炎ウイルス遺伝子の内訳

事例番号	検体番号	患者・従業員	NoV型別		その他の胃腸炎ウイルス	用いたMiSeq Reagent Kit
			ダイレクトシーケンス	メタゲノム解析 (リード数の多い順)	メタゲノム解析 (リード数の多い順)	
4	5 <sup>(*)</sup>	従業員 (無症状)	GII.12	GII.12	-	Micro v2 (300 cycles)
	6	従業員 (無症状)	GII.4	GII.4	AiV	Micro v2 (300 cycles)
	7	患者	GII.4	GII.4,GII.12,GI.3	AiV	v3 (150 cycles)
	8	患者	GII.4	GII.12 他	AiV	v3 (150 cycles)
	9	患者	ND	GII.12,GI.3	AiV	v3 (150 cycles)
	10	患者	ND	GII.12,GI.3	AiV	v3 (150 cycles)
	11	患者	ND	GII.12,GI.3 他	AiV	v3 (150 cycles)
5	12	患者	GII.17	GII.17,GII.4	AiV	Micro v2 (300 cycles)
	13	患者	GII.4	GII.4	AiV	Micro v2 (300 cycles)
	14	患者	GI.6,GII.4	GII.4,GI.6	AiV	Micro v2 (300 cycles)
	15	従業員 (無症状)	ND	GII.12,GI.3 他	AiV	v3 (150 cycles)
6	16	患者	GI.7	GI.7,GI.3,GI.9 他	-	v2 (500 cycles)
7	17	患者	GII.2	GII.2,GI.3	-	v2 (500 cycles)
8	18	患者	GII.14	GII.14,GII.7	AiV,SaV	Micro v2 (300 cycles)
	19	患者	GII型不明 (混合配列)	GII.14,GII.7,GII.6	SaV,AiV	Micro v2 (300 cycles)
	20	患者	GI.3	GI.3,GII.12	AiV	v3 (150 cycles)
	21	患者	GII.14	GII.14,GII.12	AiV	v3 (150 cycles)
	22	患者	GII.14	GII.14,GII.12	AiV	v3 (150 cycles)
	23	患者	ND	GI.3,GII.12	AiV	v3 (150 cycles)
	24	患者	ND (SaV GI.2検出)	GII.12,GII.1	AiV	v3 (150 cycles)

ND：検体番号 15 はリアルタイム PCR で GII 陽性、PCR 陰性。その他はリアルタイム PCR で検出されず。

AiV：アイチウイルス

(\*)：表 7 検体番号 5 と同一検体

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出法に関する研究」

総合研究分担報告

### ウイルスの食品検査の精度管理

研究分担者	鈴木 達也	一般財団法人食品薬品安全センター
研究協力者	渡辺 卓穂	一般財団法人食品薬品安全センター
	中阪 聡亮	一般財団法人食品薬品安全センター
	梅津 麻実	一般財団法人食品薬品安全センター
	野田 衛	国立医薬品食品衛生研究所
	上間 匡	国立医薬品食品衛生研究所
	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ー
	武差 愛美	青森県環境保健センター
	斎藤 博之	秋田県健康環境センター
	秋野 和華子	秋田県健康環境センター
	植木 洋	宮城県保健環境センター
	木村 俊介	宮城県保健環境センター
	菅原 直子	宮城県保健環境センター
	田村 務	新潟県保健環境科学研究所
	青木 順子	新潟県保健環境科学研究所
	広川 智香	新潟県保健環境科学研究所
	名古屋 真弓	富山県衛生研究所
	稲崎 倫子	富山県衛生研究所
	森 功次	東京都健康安全研究センター
	宗村 佳子	東京都健康安全研究センター
	永野 美由紀	東京都健康安全研究センター
	木本 佳那	東京都健康安全研究センター
	入谷 展弘	大阪市立環境科学研究所
	三好 龍也	堺市衛生研究所
	山本 美和子	広島市衛生研究所
	飯塚 節子	島根県保健環境科学研究所
	山下 育孝	愛媛県衛生環境研究所
	溝田 文美	愛媛県衛生環境研究所
	吉富 秀亮	福岡県保健環境科学研究所

原田 誠也	熊本県保健環境研究所
吉岡 健太	熊本県保健環境研究所
岩切 章	宮崎県衛生環境研究所

## 研究要旨

国内で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調査を行った。調査検体は糞便検体（陽性または陰性）および標準 cDNA 溶液とした。平成 25 年度には検査方法を 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、検査結果のばらつきが軽減された。また、標準 cDNA 溶液において共通の検査方法のほうがばらつきが小さかった。そのため、平成 26 年度は検査方法を共通の方法のみとし、検量線作成用 cDNA 溶液については平成 25 年度と同様とした。その結果、平成 25 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。同様に、糞便試料についても明らかな異常値を除くことで、検査結果が収束する傾向が認められた。これまでの結果から、ノロウイルス検査における検査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、検査結果のばらつきがなるべく小さくなるように、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、外部精度管理調査を実施した。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解析を換算値で行うことにより 1 オーダー以内のばらつきとなった。なお、実数解析と対数解析を比較した際に対数解析のほうが変動係数が小さくなることは平成 25 年度から 27 年度のいずれにおいても認められた傾向であった。また、平成 27 年度の対数解析結果はその変動係数から判断して各検査機関の評価を行うに十分であると判断し、その評価方法を検討した。平成 27 年度は 2 回の繰り返し測定を行っていることから、z-スコアおよび  $\bar{X}$ -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。

以上のことから、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。

## A. 研究目的

食品検査はその食品の安全性を担保するためのひとつの手段であるが、この検査結果をもって市場への流通の可否を判定することになることから、その結果の妥当性を明確にする必要がある。また、一定の基準で結果を判断するためには、どの検査機関で実施しても同等の検査結果が得られることが求められる。そのためにも結果の信頼性を確保する必要があり、食品検査については平成9年度よりGLP制度が導入された。また、国際的な試験所認定でもあるISO/IEC17025では定期的な技能試験への参加が求められている。現在、一般的な微生物検査については国内においても技能試験が実施されているが、ノロウイルス検査については国内では導入されていない。予備的な多施設比較試験において、ノロウイルス検査は比較的検査結果のばらつきが大きいことが予想されたことから、外部精度管理調査での評価を行ううえで大きな問題となることが考えられた。そこで、本課題では国内でノロウイルス検査を実施している検査機関(12または11機関)を対象として、共通検体を配布することにより現状での検査精度およびばらつきの要因の解析を行うこととした。また、得られた検査結果をもとに外部精度管理調査を行う最も大きな課題である参加機関の評価を行うための手法についても検討することとした。

## B. 研究方法

### 1. 調査検体

調査検体は糞便乳剤および標準cDNA溶

液とした。なお、糞便乳剤において平成25年度は3種(陽性検体:2種、陰性検体:1種)、平成26年度は5種(陽性検体:4種、陰性検体:1種)、平成27年度は7種(陽性検体:6種、陰性検体:1種)とした。また、調製した調査検体の均一性確認試験は国立医薬品食品衛生研究所で実施した。

### 2. 外部精度管理調査の実施

協力機関である12機関(平成27年度は11機関)を対象として、国立医薬品食品衛生研究所より調査検体の発送を行った。なお、検査方法については平成25年度はあらかじめ指定した共通の検査方法および各検査機関で通常採用している検査方法の2種、平成26年度以降は共通の検査方法のみとした。また、検量線作成用cDNA溶液は、平成25年度および平成26年度は共通(以下、配布DNAとする)および各検査機関で通常採用している標準溶液(以下、機関DNAとする)、平成27年度は配布DNAのみとした。これらについて各検査機関より結果を回収し、得られた結果について統計解析を行った。なお、統計解析および $\bar{X}-R$ 管理図の作成はJMP ver. 11を、z-スコア管理図の作成にはMicrosoft Excel 2010を使用した。さらに、各検体および検査方法間の平均値の群間比較はTukey-KramerのHSD検定により行い、 $p < 0.05$ のとき有意差ありとした。

(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. 平成 25 年度の外部精度管理調査結果

まず初めに、各検査機関の検査精度の現状把握を目的として共通の検査方法および各検査機関で採用している検査方法の 2 種および検量線作成用 cDNA 溶液を配布 DNA と機関 DNA の 2 種を用いて、1 検体につき上記の 4 種のパターンで検査を実施した検査結果について解析を行った。その結果、検量線作成用 cDNA 溶液で比較すると、機関 DNA よりも配布 DNA で検査結果のばらつきが小さくなった (図 1)。また、標準 cDNA 溶液では共通の検査方法のほうがわずかにばらつきが小さくなった (図 1)。さらに検量線において検量点として採用した 4 濃度について、配布 DNA および機関 DNA の両方でそれぞれについて定量したところ、明らかに乖離が認められた (図 2)。

### 2. 平成 26 年度の外部精度管理調査結果

平成 25 年度の外部精度管理調査結果をもとに、変動要因としての検査方法を一定とするため、検査方法を共通とし、同様に外部精度管理調査を行った。すなわち、検量線作成用 cDNA 溶液を配布 DNA と機関 DNA の 2 種を用いて、1 検体につき上記の 2 種のパターンで検査を実施した結果について解析を行った。その結果、平成 25 年度と同様に標準 cDNA 溶液において配布 DNA のほうが機関 DNA よりも検査結果のばらつきが小さくなったが、範囲は 1 オーダー以上であった (図 3)。これに対して検体では、異常値を除くことで検査結果が収束する傾向が認められた (図 3)。なお、検量線についても平成 25 年度と同様、配布 DNA と機関 DNA で乖離

が認められた (データには示していない)。

### 3. 平成 27 年度の外部精度管理調査結果

これまでの結果を踏まえ、外部精度管理調査として参加機関の評価を行ううえで、変動係数を小さくする必要があったため、ばらつきをなるべく小さくことを目的とし、検査方法、検量線作成用 cDNA 溶液、検査担当者の限定により行うこととした。その結果、標準 cDNA 溶液において、平成 25 年度および平成 26 年度の結果と比較して明らかに検査結果のばらつきが小さくなり、対数変換値として範囲は 0.1 であった (図 4)。また、高濃度検体および低濃度検体はいずれも同一濃度の 3 本で構成されていたが、この平均値の群間比較を行ったところ、各平均値に有意差は認められなかった (図 5)。なお、高濃度検体と低濃度検体で比較すると、低濃度検体でよりばらつきが大きくなる傾向が認められた。

### 4. 参加機関の評価方法の検討

外部精度管理調査は、得られた結果をもとに参加機関を評価することが最大の目的となる。また、技能試験において一般的に採用されている評価手法である z-スコアは、より正確な値を算出するために、正規分布に近似することが求められている。そのため、今回の外部精度管理調査結果を用いて評価を行う場合にも、変動係数はある程度小さい必要がある。これは標準偏差が大きくなることにより、許容される範囲も広くなるため、検査精度としての有効性が担保できなくなるためである。これまでの検査結果を観察した場合、平成 27 年度における結果は対数解析で検体 1mL あたりの換算値を採用す

ることにより、低濃度の糞便試料においても変動係数が小さくなることから、評価に耐えうると判断した。そこで、平成 27 年度の結果を用いて各参加機関の評価を行うための手法について検討した。先に記載したとおり、一般的な技能試験の評価方法として z-スコアが挙げられるが、今回は 2 回の繰り返し測定を行っていることを考慮して、2 回測定範囲も評価対象として加えるべく、Xbar-R 管理図を採用することとした。なお、Xbar-R 管理図は食品衛生外部精度管理調査における理化学調査および微生物学調査でも採用している評価方法である。食品衛生外部精度管理調査の理化学調査では Xbar 管理図の管理限界線として、添加量の 70~120% を、微生物学調査では平均値の 30~300% を設定している。しかし、ノロウイルス検査ではこのような回収率等をもとにした管理限界線の設定を行うことは難しいと考えられたことから、z-スコアにおける管理限界値である  $|z\text{-スコア}|=2$  を管理限界線の値として設定することとした。すなわち、Xbar-R 管理図と z-スコア管理図を併用することで評価を行うことを試みた。その結果、この方法により平均値および範囲のいずれにおいても限界外値を検出することができた (図 6)。

#### D. 考察

ノロウイルス検査の外部精度管理を正しく行うためには、ばらつきの小さな結果を得る必要がある。そのためには、現状においてノロウイルス検査を実施している検査機関でどのような結果が得られるのかについて観察する必要がある。そ

こで、ばらつきが小さくなることを想定した共通の検査方法および検量線作成用 cDNA 溶液の配布に加え、通常検査機関での実施方法について比較することとした。その結果、機関 DNA を用いたときの糞便試料および標準 cDNA 溶液の定量値は配布 DNA を用いたときの定量値と比較して明らかにばらつきが大きかった。また、検量線の検量点として採用した 4 点の濃度を配布 DNA と機関 DNA でプロットしたところ、濃度差が認められた。このことから、ノロウイルス検査における検査結果のばらつきの要因として、検量線作成用 cDNA 溶液の影響が非常に大きいものと考えられた。また、共通の検査方法でのばらつきの軽減は予想よりは小さかったが、これは今回提示した検査方法の経験が浅かったことに基づく可能性も否定できなかった。そのため、ばらつきの要因を限定化するため、平成 26 年度は検査方法を共通とし、検量線作成用 cDNA 溶液を配布 DNA と機関 DNA の 2 種を用いて行った。その結果、平成 25 年度と同様、検量線における検量点として採用した 4 濃度の定量値が大きかった。このことから、各検査機関で採用している検量線作成用 cDNA 溶液に濃度差があり、これが定量値に大きな影響を及ぼしていることが確実となった。しかし、これ以外にもばらつき要因が認められたが、平成 26 年度は転記ミス等があってもそのままデータを採用したことから、これがばらつきの要因となっている可能性も考えられた。そのため、平成 27 年度はばらつきが小さくなるような試験デザインとすることとした。すなわち、検査方法の共通化、検量線作



成用 cDNA 溶液の共通化、検査担当者の限定である。その結果、糞便試料および標準 cDNA 溶液の対数解析における換算値の範囲は小さくなった。このことは、検査方法等を規定することで検査精度が高まる可能性を示している。さらに標準 cDNA 溶液の範囲は 0.1 であり、リアルタイム PCR を実施する際の機器および測定操作についても全く問題なく、精度よく検査が実施されているものと判断された。しかしながら、平成 25 年度および平成 26 年度についても同様の検査方法および検量線作成用 cDNA 溶液の既定は行ったが、平成 27 年度ほどの検査精度は確認されなかった。そのため、平成 27 年度に得られた結果が継続して観察されるものであるのかについても確認の必要があると考えられる。また、糞便乳剤は抽出操作のみを対象としていることから、実際の食品基材とは測定溶液の作製方法で異なる部分も多い。また、濃縮操作はより一層のばらつきが認められる可能性も考えられることから、食品中のノロウイルス検査を行う場合には、より実際の検査に近い状態での調査検体の提供も含めて検討する必要があると思われる。

#### E. 結論

ノロウイルス検査の外部精度管理調査を行うことを目的として、現状での各検査機関の検査精度の確認および参加機関の評価方法の検討を行った。また、開始当初よりばらつきが大きいことが懸念されたため、検査方法および検量線作成用

cDNA 溶液を共通化することも併用した。その結果、検量線作成用 cDNA 溶液の濃度に各検査機関間で差異が認められ、これが調査検体の定量値に対して大きな影響を及ぼしている可能性が示唆された。また、平成 27 年度の結果から検査方法等を規定することで検査精度が高くなる可能性が考えられたが、この結果が継続的に得られるのかについて引き続き観察する必要があると考えられた。さらに平成 27 年度に得られた結果をもとに、参加機関の評価を行うため、技能試験において一般的に採用されている  $\bar{x}$ -スコアおよび繰り返し測定のみによるばらつきも評価できる  $\bar{x}$ -R 管理図を併用することにより、評価が可能であると考えられた。なお、検査機関の評価を正しく行うためには、変動係数がある程度小さくする必要があるが、対数解析の 1mL あたりの換算値を採用することで対応できるものと考えられた。

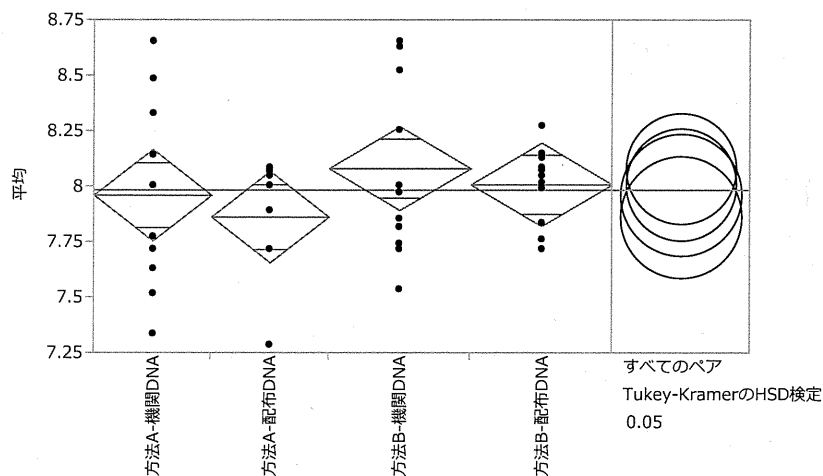
#### F. 研究発表

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

## 標準cDNA



## 検体-2

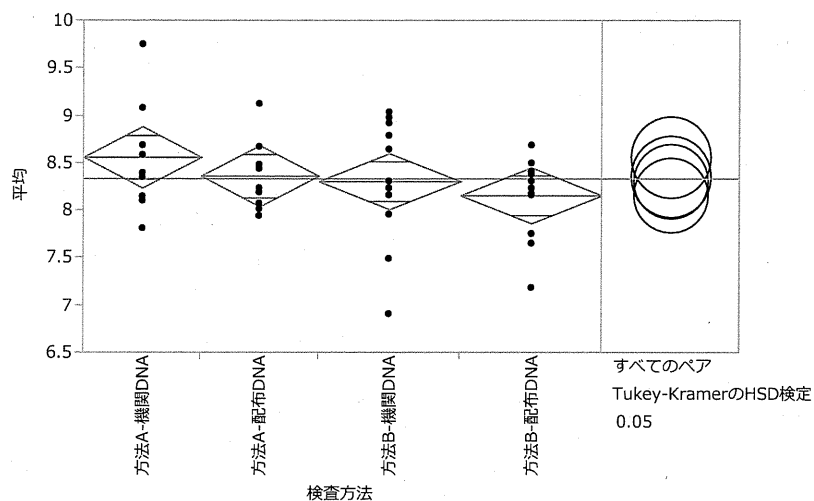


図1 平成25年度における標準cDNA溶液および検体-2の外部精度管理調査結果  
 検体については陽性検体として実施した2種のうち1種を代表例として示した。また、  
 平均値の群間比較はTukey-KramerのHSD検定により行った。

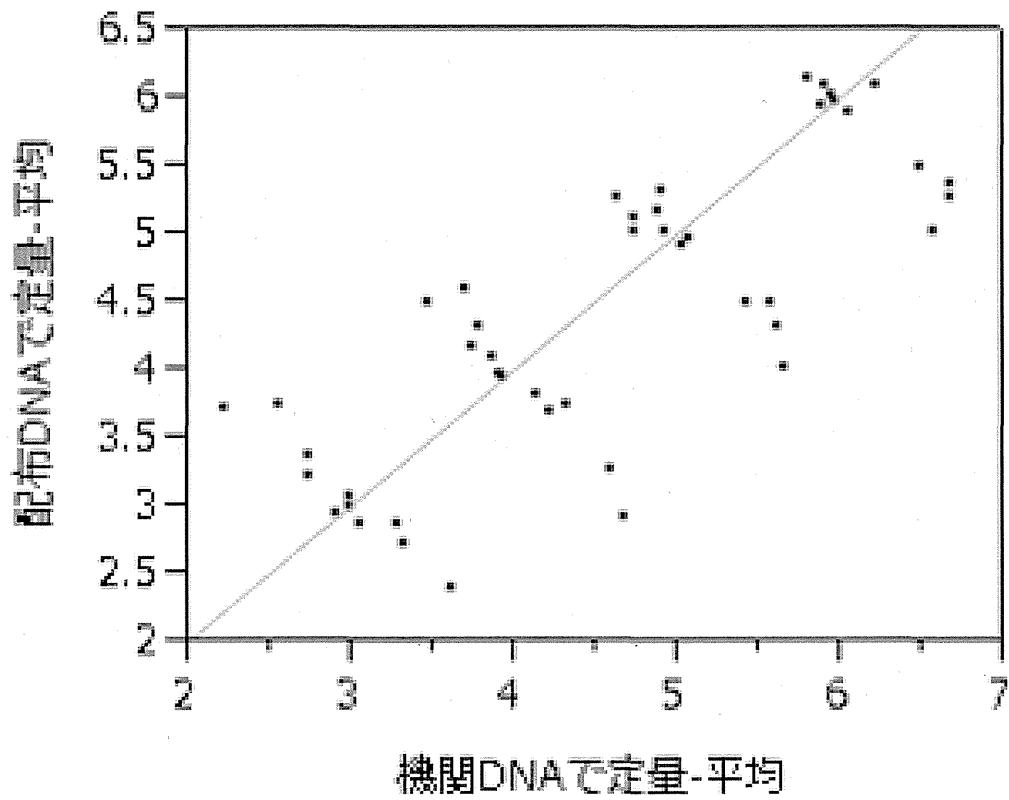
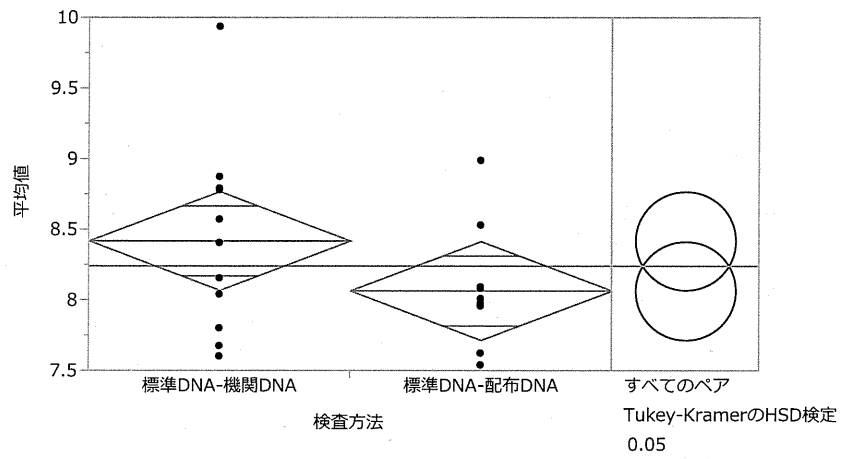


図2 平成25年度における検量線作成用cDNA溶液の相互定量結果

## 標準cDNA



## 検体-2

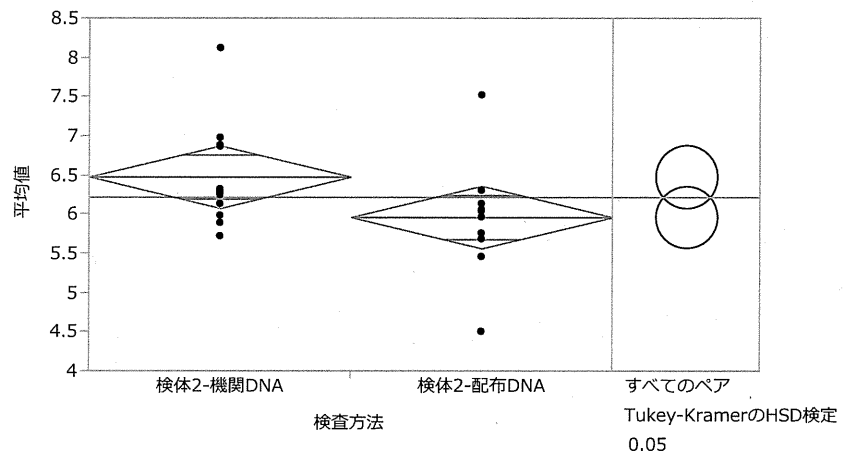


図3 平成26年度における標準cDNA溶液および検体-2の外部精度管理調査結果  
 検体については陽性検体として実施した4種のうち1種を代表例として示した。また、  
 平均値の群間比較はTukey-KramerのHSD検定により行った。

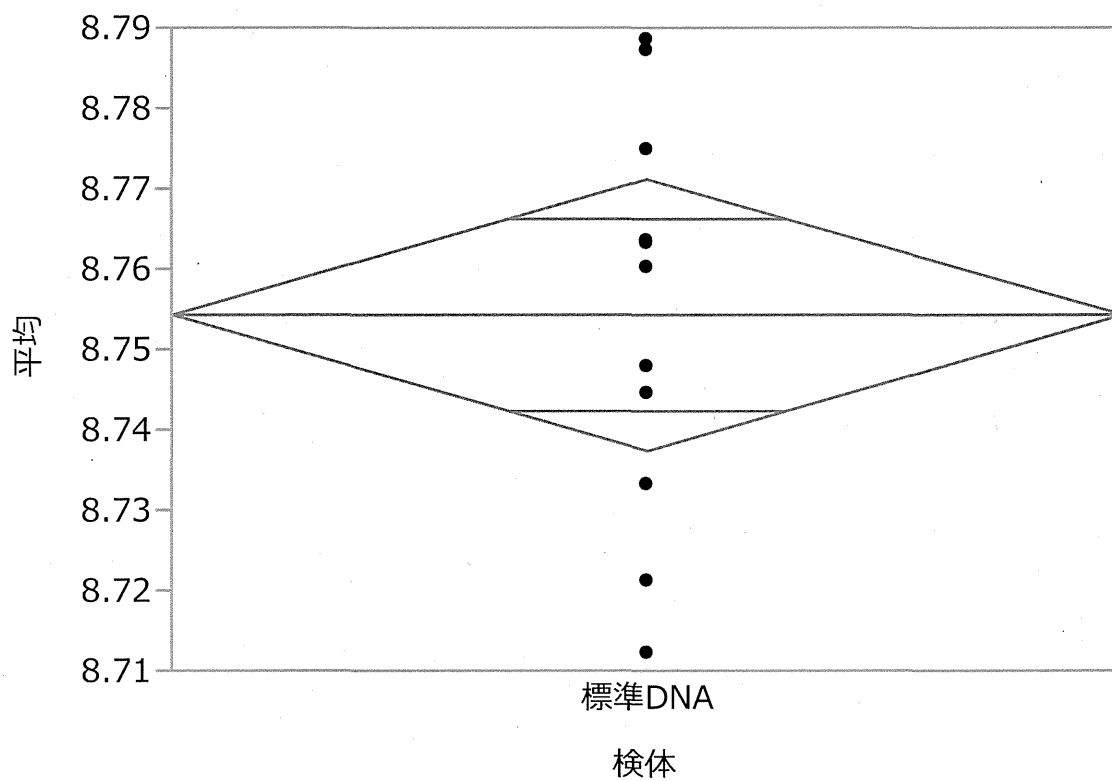
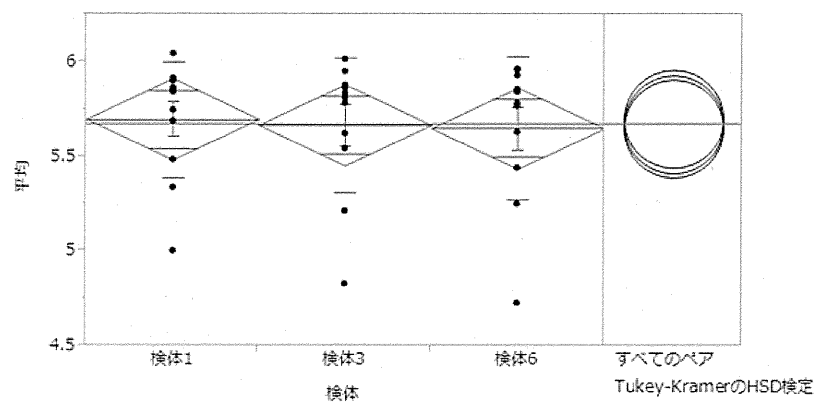


図4 平成27年度における標準cDNA溶液の外部精度管理調査結果

## 高濃度検体



## 低濃度検体

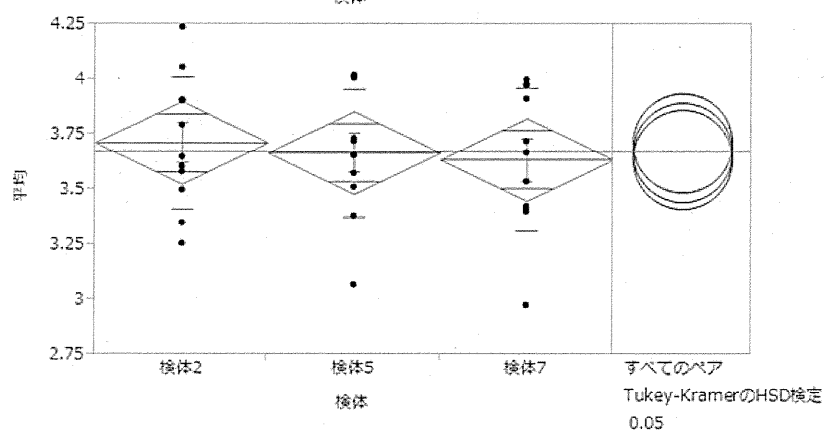


図5 平成27年度における高濃度検体、低濃度検体の外部精度管理調査結果  
結果は陽性検体（6検体）のみ示した。また、平均値の群間比較は Tukey-Kramer の  
HSD 検定により行った。

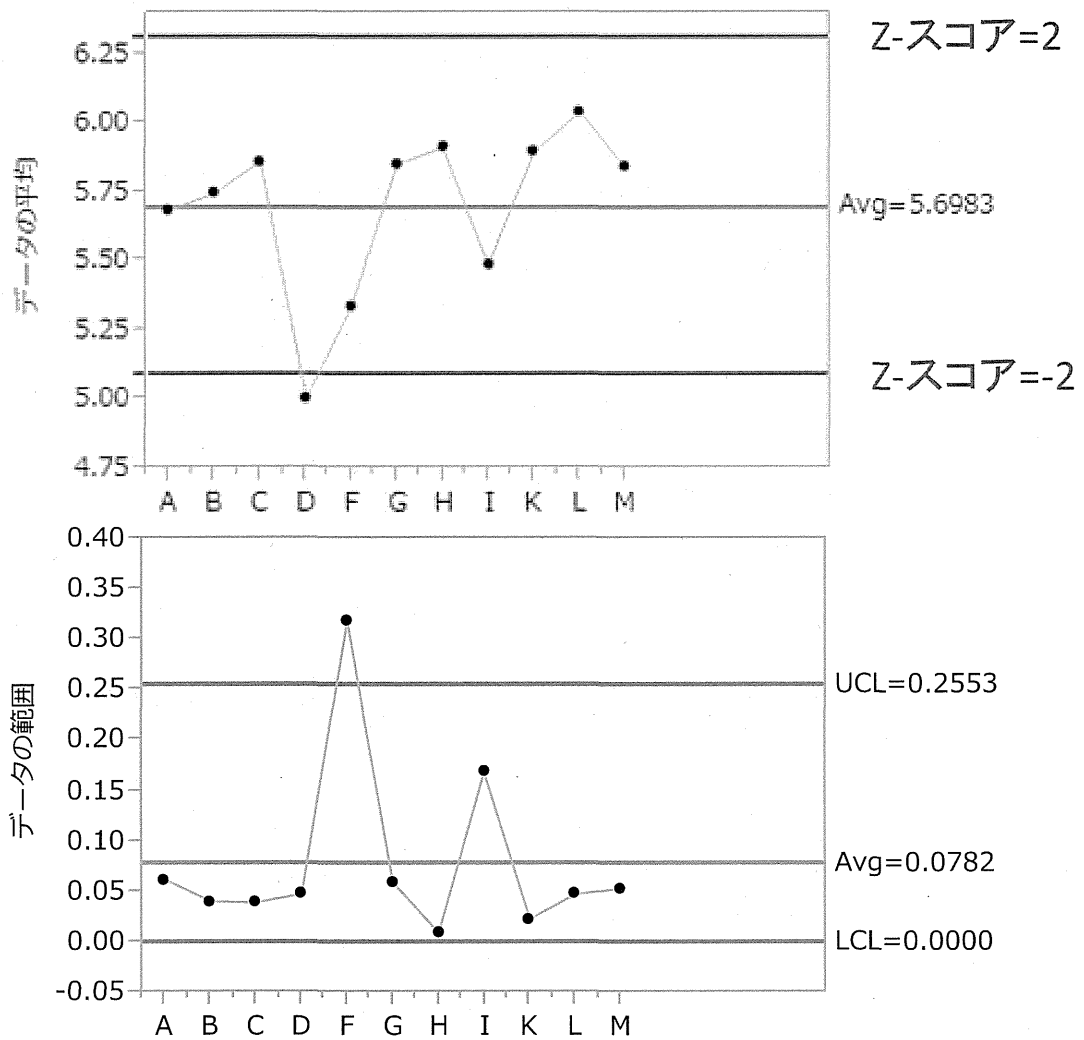


図 6 平成 27 年度における参加機関の Xbar-R 管理図を用いた評価 (検体-1)  
 標準 cDNA 溶液および検体 6 種の代表例として示した。  
 Xbar 管理図における管理限界線は当該検体の平均値および標準偏差から算出した  $|z\text{-スコア}|=2$  の値とした。R 管理図における管理限界線は、R の平均値に JIS の係数表から求めた係数を乗ずることで算出した。

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出法に関する研究」

研究分担報告

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

研究分担者      上間 匡      国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

1. 現在ウイルスが関与する食中毒および感染性胃腸炎事例においては迅速に結果を求められることからウイルス遺伝子を検出するPCR法が各検査機関で実施され、原因食品や感染ルートの解明には検出ウイルスの塩基配列の相同性一致の確認による科学的根拠の提示が求められる。しかしながら、食中毒事例(とくに二枚貝関連事例)では患者間、あるいは食品と患者間で検出される遺伝子型が異なる場合や1人から複数の遺伝子型が検出されるなど原因特定が困難な事例も少なくないという現状がある。

二枚貝や食品、臨床検体には複数の遺伝子型のノロウイルスが含まれる可能性があるが従来のクローニングやダイレクトシーケンスでは、検体に含まれるごく一部の主要な遺伝子型のみしか検出できない状況であった。検体に含まれる複数のノロウイルスの遺伝子型を可能な限り検出するための検査法の確立を目的に、次世代シーケンサを用いた網羅的解析法の適用について検討した。

H25 年度は次世代シーケンサでの解析を行うにあたり、ノロウイルス陽性の糞便検体より抽出した RNA を用いてノロウイルス遺伝子の網羅的解析法の確立を行った。H27 年度には H25 年度に確立した方法を用いて、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行い現状把握を試みた。その結果、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。

2. 現在ノロウイルス (NoV)、A 型肝炎ウイルス (HAV) 等を対象に PCR を用いた遺伝子検出が行われ、検査手法の検証には内部コントロールとしてネコカリシウイルス (FCV) やマウスノロウイルス (MNV)、エコーウイルス 9 型、メンゴウイルス (Mengo virus, MeV)、コクサッキーウイルス B 群 5 型 (CB5) 等が利用されているが、一部を除いて陽性コントロールの作成や配布体制が整っていない。



H26年度に本研究では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・検討を行う為の陽性コントロールの作成を行った。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、サイバークリーン検出系リアル・タイムPCRへの応用を検討し、約670塩基の長鎖をリアルタイムPCRで検出するための条件を見出した。

3. 食品媒介ウイルスの検出法については厚生労働省通知法に基づいて実施されるが、各機関で使用する検査機器や試薬、検査手順については基本仕様以外は統一されていないため、各機関で実施される検査結果を厳密に同等のものとして比較することが困難な現状となっている。

この現状を踏まえ、H27年度は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を用いて国立医薬品食品衛生研究所にて同時に定量を行い、機関ごとのばらつきの現状確認を行った。その結果、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ことが示された。

## 1. 食品等から検出されるノロウイルス遺伝子の網羅的解析

### A. 研究目的

現在ウイルスが関与する食中毒および感染性胃腸炎事例においては迅速に結果を求められることからウイルス遺伝子を検出するPCR法が各検査機関で実施されており、迅速性の点から主にリアルタイムPCRによって原因ウイルスの検出が行われている。原因食品や感染ルート of さらに詳細な解明のためには検出ウイルスの塩基配列解析を行い、患者間、患者・食品間で検出されるウイルスの遺伝子型の相同性比較による科学的根拠の提示が求められる。しかしながら、食中毒事例(とくに二枚貝関連事例)では患者間、あるいは食品と患者間で検出される遺伝子型が異なる場合や1人から複数の遺伝子型が検出されるなど原因

特定が困難な事例も少なくない。

二枚貝や食品、臨床検体には複数の遺伝子型のノロウイルスが同時に含まれる可能性があるが従来のクローニングやダイレクトシーケンスでは、検体に含まれるごく一部の主要な遺伝子型のみしか検出できない状況であった。検体に含まれる複数のノロウイルスの遺伝子型を可能な限り検出するための検査法の確立を行い、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行い現状把握を試みた。

### B. 研究方法

#### 1. 材料

##### 1-1. 検体

網羅的解析法のプロトコール作成の検討には、GII.4ノロウイルス陽性糞便検体より抽出

した RNA および遠心操作によりウイルスを簡易精製したのちに抽出した RNA を用いた。

市販カキ中に含まれるノロウイルスの網羅的解析には複数の海域から 1 週おきにカキを入手した(カキは1海域1ロット)。本報告では 2015 年 11 月 9 日から 2015 年 11 月 30 日までの合計 25 ロット(表 1)。

## 2. 方法

### 2-1. カキからの NoV 検出

カキから NoV RNA を抽出し逆転写にて cDNA を合成する際に同一ロットについて通知法に準じてランダムプライマーを用いて逆転写を行う従来法と、dT プライマーを用いる感染性推定遺伝子法(推定法)の 2 法で RT-PCR を行った(25 ロット 50 検体)

### 2-2. 次世代シーケンス用 PCR

通知法に準じた RT-nested PCR にて NoV GI または GII 陽性となった検体について、1stPCR 産物から Life Technologies ION PGM での解析用に 2nd PCR を実施した。

1st PCR では GI 遺伝子群増幅に COG1F/G1-SKR, GII 遺伝子群増幅に COG2F/G2-SKR のプライマーセットを用いた。

2nd PCR では GI 遺伝子群増幅に G1-SKF/G1-SKR, GII 遺伝子群増幅に G2-SKF/G2-SKR を用いた。ION PGM 解析用には 2nd PCR 用プライマーに ION PGM 用の Tag 配列を付加したプライマーを作成した。

### 2-3. 次世代シーケンス

網羅的解析法プロトコール作成のために抽出 RNA を逆転写, 解析用 RNA タグを付加し, Life Technologies 社 ION PGM にて RNA の網羅的解析を行った。

また, 2-2. に示すように抽出 RNA からノロウイルス特異的 RT-PCR を行い, 増幅された PCR 産物について Life Technologies 社 ION PGM にて網羅的解析を行った。

市販カキ中のノロウイルスの網羅的解析については 2-1. 2-2. に示すようにノロウイルス特異的 RT-PCR にて遺伝子を増幅し Life Technologies 社 ION PGM にて解析を行った。

### 2-4. NoV 遺伝子型の解析

ローカル BLAST により次世代シーケンスにて得られた NoV 遺伝子の遺伝子型決定を行った。

(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

### C-1. 抽出 RNA の網羅的解析

糞便から抽出した RNA については常法に従い抽出した RNA および, 遠心操作にて簡易的にウイルスを精製した後に抽出された RNA を断片化後に解析する方法により, 糞便検体由来の RNA から直接ノロウイルスを検出出来るかを検討した。

その結果, ウイルスの精製に関わらず, 抽出 RNA の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陽性糞便であってもノロウイルスの検出は困難であった(データ示さず)。

RNA の断片化後 200-400base の長さの RNA の解析を行うために精製を実施したが, 100base 未満の短い断片が多く精製され

PCR 効率が悪くなる結果となり, 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.

#### C-2. ノロウイルス特異的 PCR 産物の解析

C-1. と同様の RNA を用いて通知法に従ってノロウイルス特異的 RT-PCR を実施し, 得られた PCR 産物について網羅的解析を行った結果, 解析によって得られたリード(クローン)は GII. 4 と一致するリードが得られた.

#### C-3. 市販カキ検体の陽性率

通知法 RT-PCR により 25 ロット 50 検体の市販カキのうち GI 遺伝子群は 2 検体, GII 遺伝子群は 7 検体が NoV 陽性となった(表 1).

#### C-4. 市販カキ検体の次世代シーケンスの結果

合計 9 検体について ION PGM を用いてシーケンス解析を行った結果, 合計リード数 2, 194, 520 リードを得た. 取得リードのうち 200base 以上の長さを持つリードは 1, 064, 888 リード(48. 5%), 250base 以上の長さを持つリードは 383, 281 リード(17. 5%)であった.

#### C-5. 市販カキ検体の NoV 遺伝子型 BLAST 検索

250base 以上のリードについてローカル BLAST を実施した結果を表 1 に示す. GI 遺伝子群では GI. 4, GI. 5, GI. 16 が, GII 遺伝子群では GII. 3, GII. 4, GII. 13, GII. 17 が検出された. GII 遺伝子群のうち, 多くは GII. 3 または GII. 13 であった. また検体 No. 19 については従来法および推定法にて GII 遺伝子が検出されたが, 興味深いことに従来法では GII. 3 と GII. 13 が主要であったのに対して, 推定法では GII. 4 が主要な遺伝子群となっていた(表 2).

また検体 No. 25(11 月 30 日)では GII. 17 のみが検出され, GII. 3, GII. 13 が検出されない結果となった.

200base 以上のリードについて同様に BLAST を実施した結果, 検出される遺伝子型の傾向は 250base 以上のリードの解析とほぼ同様であった(表 1).

100-200base の短いリードについても同様に BLAST を実施した結果, 250base, 200base 以上のリードの解析結果と同様の遺伝子型検出の傾向を示し, ほぼすべてのリードが NoV と判定された.

#### D. 考察

生食されるカキをはじめとした二枚貝は, 成長過程で大量の海水を体内にとりこみ, 消化管内でプランクトンなどを濾しとるという性質から, ノロウイルス等の環境中に存在する病原微生物の汚染リスクが存在するとともに, 体内に同時に複数の病原体を蓄積する可能性が非常に高い. このことから, とくに二枚貝が関連する食中毒事例や感染性胃腸炎事例においてはカキ等の食品から複数の遺伝子型のウイルスが検出されたり, 患者・食品間, 患者間で異なる遺伝子型のウイルスが検出されるなど, 詳細な感染ルートや原因食品の解明の際に求められる科学的な根拠を示すことが困難な事例が少なくない, という問題がある.

本研究では原因究明が困難な食中毒事例等において, 患者糞便や食品から抽出した RNA を直接網羅的に解析してノロウイルスを検出するための出来るだけ簡便なプロトコールの作成と実際の検体からの検出遺伝子型の検討

を行った。

まず、検体から抽出した RNA について直接網羅的解析を実施するには、検体にノロウイルスが十分な量含まれると予想される陽性糞便由来の RNA であってもノロウイルス RNA の絶対数が少ないために網羅的解析ではうまく検出出来なかった。RNA を直接解析するにはウイルスの精製条件などを詳細に検討する必要がある。特異的 PCR を実施したのちに網羅的解析を行うアンプリコンシーケンスでは検体に含まれるノロウイルスの遺伝子型解析が可能であった。

市販カキに含まれる複数の遺伝子型の NoV を同時にできるだけ検出できる方法の一つとしてのアンプリコンシーケンスでは、通常検査で実施されているダイレクトシーケンスやクローニングでは不可能な 1 検体あたり数千から数万クローンの遺伝子解析を行うことが可能であった。

この手法により、NoV 陽性カキ検体からは最大 3 遺伝子型を検出することができ、通知法の検査のあとにより詳細な解析を行う手法として次世代シーケンサーによる網羅的解析が有用であることが示された。

また、本解析ではリードの長さが 100-200base と短いリードも多数得られたが、これらのリードについてもそのほとんどがローカル BLAST で NoV と判定され、通知法の NoV 検出 RT-PCR が NoV を特異的に検出していることが示された。

検出遺伝子型の分布については、11 月 9 日から 25 日までは GII. 3 や GII. 13, GII. 4 が検出されていたのに対して、11 月 30 日の検体か

らは GII. 17 のみが検出されており、カキに含まれる遺伝子型の動向調査にも本手法が応用出来る可能性が示された。

さらに 11 月 25 日の GII 検出検体では、逆転写にランダムプライマーを用いる従来法では GII. 3, GII. 13 が主な検出株であるのに対して、dT プライマーを用いる感染性推定遺伝子法では GII. 4 が主要検出遺伝子型となっており、カキに含まれる NoV のうち、遺伝子型によって生存性に大きな違いがある可能性が示唆される結果となった。今後従来法と推定法で同時に陽性判定された検体について同様の傾向が見られるのか引き続き検証していく必要がある。

今後食中毒事例や環境水についても応用することで、感染ルートや患者・食品間、患者間の関連性の解明や、環境からの汚染リスク評価などに科学的なデータを提供できる手法として期待できる。

## 2. 食品媒介ウイルス検査の開発と標準化の検討

### A. 研究目的

食品媒介性ウイルスの検査は主に、ノロウイルス (NoV)、A 型肝炎ウイルス (HAV) 等を対象に PCR を用いた遺伝子検出が行われ、検査手法の検証には内部コントロールとしてネコカリシウイルス (FCV) やマウスノロウイルス (MNV)、エコーウイルス 9 型等が利用されている。一方で 2013 年には国際標準化機構 (ISO) より食品検体等からの NoV と HAV の遺伝子検出法 (ISO/TS 15216-1:2013) が公開され、内部コントロールとして FCV の他、メンゴウ