

イルス (Mengovirus; MeV) が指定された。また、当方で開発した感染性推定遺伝子検査法では内部コントロールとして FCV に加えてコクサッキーウイルス B 群 5 型 (CB5) を利用している。

以上のように食品検体等からのウイルス遺伝子検出法は共通の検査手技としては RT-PCR および RT-qPCR であるが、検査用の陽性コントロールの配布体制は市販キットに付属する NoV や一部研究機関から分与される HAV の他は検体由来の cDNA を利用する必要があるなどすべてのウイルスを利用するための検査体制は整っていない。

本研究では、HAV 検出通知法の改良法に対応した陽性コントロールプラスミドの他、ISO/TS 15216-1:2013 に記載された MeV の検出系に対応する陽性コントロールプラスミドの作成を行った。また、代替ウイルスとしての評価を得る目的で CB5 と MeV を感染性推定遺伝子検査法に応用するために感染性推定遺伝子検査法に対応した陽性コントロールプラスミドを作成した。

また、HAV 検出改良法については、コンベンショナルな RT-PCR だけでなく、サイバーグリーン検出系を用いたリアルタイム PCR を検討し、通知法では別々に実施する必要のあるリアルタイム PCR とコンベンショナルな RT-PCR の一本化について検討した。この方法が確立すれば一度の PCR 実施によりリアルタイム PCR による検出と分子疫学解析が同時に行え、検査の時間短縮等が期待出来る。

B. 研究方法

1. 材料

1-1. ウイルスおよびウイルス RNA

A 型肝炎ウイルス KRM238G59 株培養上清から抽出した RNA より逆転写で作成した cDNA を用いた。

コクサッキーウイルス B 群 5 型 (CB5) 培養上清から抽出した RNA より逆転写で作成した cDNA を用いた。

ISO/TS 15216-1:2013 に記載されたメンゴウイルス (Mengo virus, strain MCO, ATCC No. VR-1597) を ATCC より購入し、HeLa 細胞にて増殖後に、細胞培養上清より RNA 抽出キットにてゲノム RNA を抽出し逆転写を行い cDNA を得た。

1-2. プライマー

陽性コントロールとしてプラスミドを作成するために表 3 に示すプライマーを用いた。

2-1. プラスミドの作成

HAV, CB5, MeV について、表に示したプライマーを用いて PCR を行い、PCR 産物を Zero Blunt TOPO PCR cloning kit (Invitrogen) を用いてクローニングを行った。

HAV のプラスミドについては臨床検体との区別のために表の FLAG 挿入用プライマーを用いて PrimeSTAR Mutagenesis Basal Kit (タカラバイオ) を用いて FLAG 配列を挿入した。

3-1. HAV 検出リアルタイム PCR サイクル条件の検討

リアルタイム PCR 試薬として以下の 3 社の

試薬を用いた。

SYBR® Premix Ex Taq™ II (タカラバイオ),
KOD SYBR® qPCR Mix (東洋紡),
FastStart Universal SYBR Green Master
(ROX) (Roche)

PCR サイクルとして、各試薬の推奨条件となる 2 ステップシャトル PCR {95°C 5 秒→(95°C 30 秒, 60°C 30 秒)x40 サイクル} と 3 ステップ PCR サイクル {95°C 30 秒→(95°C 5 秒, 60°C 30 秒, 72°C 60 秒)x40 サイクル} の比較を行った。

3-2. リアルタイム PCR 装置の比較

HAV 検出リアルタイム PCR を行うにあたり、以下の 2 社のリアルタイム PCR 用の装置の比較を行った。

Thermal Cycler Dice® Real Time System II
(タカラバイオ)

Applied Biosystems Fast Real-Time PCR
System (ABI)

(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. 遺伝子検出検査用 陽性コントロールプラスミドの作成

1-1. HAV

プライマー HAV-JCT-2F および HAV-JCT-1R-A

を用いて、KRM238G59 株 cDNA から PCR 増幅を行い、目的の断片を得た。PCR 断片のクローニング後にキットを用いてクローニングを行い、塩基配列の確認を行った。

その後、FLAG 挿入用プライマーセットを用いて、PrimeSTAR Mutagenesis Basal Kit (タカラバイオ)を用いて FLAG 配列の挿入を行い、塩基配列を解析し、FLAG 配列の挿入を確認した(図 1)。

1-2. MeV

ISO/TS 15216-1:2013 記載のリアルタイム PCR 用の陽性コントロールプラスミド作成のためにプライマーセット (Mengo+16-35 及び Mengo-629-607)を用いて PCR を行い、目的の断片を得てクローニング、塩基配列を確認した。

また、感染性推定遺伝子検査法へ Mengovirus を用いることが出来るように感染性推定遺伝子検査法での検出範囲を MengoFW4176-4197 および MengoRV5777-5797 を用いて PCR を行い、目的断片を得てクローニング、塩基配列を確認した。

1-3. CB5

感染性推定遺伝子検査法に用いる CB5 の陽性コントロールプラスミドを作成するために CB5 プライマーセット (CoxB5 +3609 および CoxB5 -4837)を用いて PCR を行い、クローニングと塩基配列解析を行った。

2. HAV リアルタイム PCR 条件の検討

結果 1-1 で作成した FLAG 配列入り HAV プラス

ミドを用いて、サイバークリーン系リアルタイム PCR の検討を行った。

まず、SYBR® Premix Ex Taq™ II (タカラバイオ) を用いてサイクルステップ、伸長時間等のリアルタイム PCR 条件の検討を行った。

2-1. キット説明書に従い 2 ステップサイクル {95°C 5 秒→(95°C 30 秒, 60°C 30 秒)x40 サイクル}にてリアルタイム PCR を行ったが、 10^7 コピー以下の濃度のプラスミドを検出できなかった。

2-2. 2 ステップサイクルのまま、伸長時間を 60 秒に延長して検討した {95°C 5 秒→(95°C 30 秒, 60°C 60 秒)x40 サイクル}と、 10^7 コピー以下の濃度のプラスミドの検出もされるようになったが、増幅が 30 サイクル以降となり、増幅効率が非常に悪い結果となった (図 2 上段)。

2-3. 3 ステップサイクル {95°C 5 秒→(95°C 30 秒, 60°C 30 秒, 72°C60 秒)x40 サイクル}にて PCR を行った結果、 10^5 コピーから 10^2 コピーまで検出されるようになった (図 2 下段)。HAV-JCT-2F および HAV-JCT-1R-A を用いたリアルタイム PCR は 3 ステップサイクルを行うのが良いことがわかった。

3. リアルタイム PCR 試薬の比較

3 社のリアルタイム PCR の性能比較を行った。SYBR® Premix Ex Taq™ II (タカラバイオ) および KOD SYBR® qPCR Mix (東洋紡) は 3 ステップサイクル {95°C 5 秒→(95°C 30 秒, 60°C 30 秒, 72°C60 秒)x40 サイクル}で行い、

Hotstart 酵素を使用する FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) (Roche) は 10 分のプレインキュベーション後に 3 ステップサイクル {95°C 10 分→(95°C 30 秒, 60°C 30 秒, 72°C60 秒)x40 サイクル}を行った。

その結果、HAV-JCT-2F および HAV-JCT-1R-A を用いたリアルタイム PCR は 3 試薬ともに同等の結果を得ることが出来た (図 3)。

4. リアルタイム PCR 装置の比較

2 社のリアルタイム PCR 装置 Thermal Cycler Dice® Real Time System II (タカラバイオ) および Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (ABI) の性能を比較するために KOD SYBR® qPCR Mix (東洋紡) を用いて 3 ステップサイクル {95°C 5 秒→(95°C 30 秒, 60°C 30 秒, 72°C60 秒)x40 サイクル}で検討を行った。その結果、ABI の装置がプラスミド各濃度の増幅開始が 3 サイクル程度早く、約 10 倍程度の検出感度の高さであったが、2 社の装置共に、同等に使用できることを確認した (データ示さず)。

5. リアルタイム PCR におけるネガティブコントロールの出現

各社の試薬、装置を用いてサイバークリーン検出系リアルタイム PCR の条件を決定したが、現在のところネガティブコントロールが 10^2 コピー未満程度検出されてしまう現象が起きている。

D. 考察

現在主に行われている食品からのウイルス

遺伝子検出において、NoV についてはタカラバイオ社等から厚生労働省通知法に従った試薬、プライマー、陽性コントロール等が検出キットとして市販されており、利用可能である。一方、A 型肝炎ウイルスについては HAV-JCT-2F, 1R-A, 2R を用いた RT-PCR については陽性コントロールプラスミドの配布体制が整っていなかった。本研究では、HAV-JCT-2F, 1R-A を用いて増幅した 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。今後各機関での HAV 検出 RT-PCR の検討を行う際に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。

また、ISO/TS 15216-1:2013 に記載された Mengovirus 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、今後 ISO/TS 15216-1:2013 にしたがった検査法の検討などに各機関で利用できるようになった。更に、MeV 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利用できるようになった。今後 NoV の代替ウイルスとして FCV, MNV と同様に利用できるのか、FCV 等と比較して有用であるかなど検討を行うことが可能である。

感染性推定遺伝子検査法の開発に用いている CB5 についても陽性コントロールプラスミドの作成を行った。CB5 を代替ウイルスに用いた検査制度管理等に利用できるようになった。

HAV 遺伝子検出用プライマーセット

HAV-JCT-2F, 1R-A を用いたサイバーグリーン検出系リアルタイム PCR が実施可能であることがわかった。HAV-JCT-2F, 1R-A および 2R のプライマーを用いた検出系は厚生労働省通知法に比べて、検出感度が高く、分子疫学解析のための解析範囲も 500 塩基以上と大きいことが利点であるが、増幅断片が長いことからリアルタイム PCR での検出には向いていなかったが、300 塩基以上の長鎖 PCR でもリアルタイム PCR 実施可能な試薬が市販されるようになり、高い検出感度と分子疫学解析能をもつプライマーセットをリアルタイム PCR で利用出来るようになった。

分子疫学解析の際には陽性コントロールとの区別が重要になってくるが、これまでは臨床検体などの陽性検体由来 cDNA 等を用いていたために陽性コントロールと検体を区別出来ない事例があったが、本研究では FLAG 配列を挿入することにより容易に臨床検体と区別可能な陽性コントロールプラスミドを作成し、検査の正確性を担保できるようになった。

また、HAV-JCT-2F, 1R-A のプライマーセットを用いたリアルタイム PCR は増幅断片が長いことから、試薬等に付属の説明書等で推奨される 2 ステップ PCR サイクルではうまく増幅できないため、3 ステップ PCR サイクルを用いて、伸長反応を長くすることで、今回約 670 塩基の長鎖でもリアルタイム PCR で検出が可能となった。また、3 社のサイバーグリーン系検出試薬及び、タカラバイオ、ABI 社のリアルタイム PCR 装置を用いて検討した結果、いずれにおいても同等の検出感度が確認され、長鎖断片を標的にしたリアルタイム PCR

の検出系が汎用的に利用できることが示唆された。

しかしながら、現状ではネガティブコントロールにも 10^2 コピー程度の反応が検出されており、プライマーダイマーによるサイバークリーンの反応や陽性コントロールのコンタミネーションなど、ネガティブコントロールが検出される原因を確認し、検査時のプライマー濃度の調整などを検討していく必要がある。

今後は、HAV-JCT-2F, 1R-A のセットおよび HAV-JCT-2F, 2R のセットを用いた RT-nested qPCR の検討や、実際の食品、臨床検体からの検出と分子疫学解析能を検証していく必要がある。

3. 食品中の病原ウイルス検出法の精度管理法の検討、デジタル PCR を利用した検査用陽性コントロールの精度管理

A. 研究目的

現在食中毒事例での推定原因食品などからのウイルスの検出には主に食品中に含まれるウイルスの定量までを短時間に行えるリアルタイム PCR が広く利用されている。

また、とくにノロウイルスによる汚染リスクがあり生食されるカキについては、リアルタイム PCR によってウイルスに汚染されていないこと、または汚染のあった場合には検出されるウイルスを定量し具体的な汚染度合いについて確認するための自主検査が生産者・出荷者によって実施されている。

検査の実施については厚生労働省の通知に

基づいて、食品からのウイルス濃縮ののち、ウイルス遺伝子 (RNA) の抽出、RNA から cDNA への逆転写およびリアルタイム PCR という大きく 4 段階の手順を行う。通知では検出法について使用する機器や試薬の指定はされず、基本的な仕様が示されており同等の性能を有する機器および試薬を各機関の状況に合わせて使用して検査が実施されている。

食中毒事例や出荷前検査に関わらず、食品中に含まれるウイルスは一般的に非常に少なく、リアルタイム PCR の機器の検出限界と同等かそれ以下のレベルの汚染の判断が求められることが多いため、検査精度を担保することは非常に重要な課題である。

最終的には、どこの機関で誰が検査を実施しても、同じ検体であれば同等の検査結果が得られるべきであるが、前述のように検査機関によって使用機器や試薬が異なる場合もあり、各機関の検査結果を全く同等に比較することが困難なのが現状であり、検査の精度管理体制の構築が課題となっている。

一方で、リアルタイム PCR による定量法では、検出遺伝子の定量の際に、定量値が既知である陽性コントロールを用いるため、検査の使用機器や試薬が異なる場合でも陽性コントロールの定量値が同等であれば、検体の定量結果も同程度であることが期待出来る。

食品からのウイルス検出法の精度管理体制構築のためには検査に用いる陽性コントロールの管理が非常に重要であり、本研究では検査現場の現状把握の目的で、各機関 (研究協力地方衛研等) で実際に使用されている陽性コントロールの一部を国立衛研に集約し、同条

件で定量を実施した場合のばらつきについて確認を行った。

B. 研究方法

1. 材料

1-1. ノロウイルス GII 陽性コントロールプラスミド

協力機関(合計 12 機関)で実際の検査に使用している陽性プラスミドの一部を国立衛研に送付してもらった。

GII 陽性コントロールは 2015 年に国立感染症研究所より新たに配布されており, 12 機関のうち 11 機関について 2015 年の新コントロールプラスミド, 8 機関については従来から使用している旧コントロールプラスミドも合わせて送付してもらった。

研究協力者

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
斎藤 博之	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
田村 務	新潟県保健環境科学研究所
滝澤 剛則	富山県衛生研究所
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
西村 浩一	熊本県保健環境研究所

1-2. デジタル PCR

測定機器にバイオラッド社の 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。

10 検体分の組成は以下の通り (1 検体あたり 20ul)。

2x Supermix	10ul
COG2F(100uM)	0.2ul
COG2R(100uM)	0.2ul
ALPF(100uM)	0.2ul
RINGAL-TP(11.2uM)	0.4ul
plasmid	2ul
DW	20ul にメスアップ

(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. デジタル PCR で測定できるコピー数の検討

バイオラッド社 QX200 では検体あたりの最大カウント数がおおよそ 20,000 カウントであることから、陽性コントロールプラスミドの測定にあたり、デジタル PCR でコピー数カウントができる最適なプラスミド濃度の検討を行った。

10^3 コピー 8 検体, 10^4 コピー 8 検体, 10^5 コピー 3 検体と陰性コントロール(蒸留水)の合計 24 検体についてデジタル PCR で定量した。

その結果, 10^3 コピーの検体では 8 検体の陽性カウントの平均が 491.9, 陰性カウント 15009.3 (合計平均 15501.1 カウント, 757.5 コピー/tube), 10^4 コピー 8 検体の陽性カウントは 4403.9, 陰性カウントは 12314.1(合

計平均 16718.0, 7200.0 コピー/tube), 10^5 コピー³ 検体の陽性カウントは 14590.0, 陰性カウントは 1349.3(合計平均 15939.3, 58600.0 コピー/tube), 陰性検体 DW の陽性カウント 8, 陰性カウント 17142(11 コピー/tube)であった(表 4).

10^3 コピーの検体の結果より, 10^2 コピーより低いコピー数の場合に陰性検体と区別ができなくなることが考えられた.

また, 10^5 コピーの検体の tube あたりのカウント数は 10^4 コピーの検体の 10 倍未満となっており, 10^5 コピー程度の検体では正確にカウントできていないことが考えられた. 以上のことから各機関の 10^4 コピーの陽性コントロールを用いて検討することとした.

2. 各機関の陽性コントロールの測定結果合計 12 機関で使用中の陽性コントロール(10^4 コピー/5 μ l に調整, 実測は検体 2 μ l を用いるので理論的には 4000 コピーとなる)を実測した結果を表 5 に示す.

2015 年に新たに国立感染症研究所より配布された陽性コントロール(11 機関提供)について, 最大値は機関 F の 22,360 コピー/2 μ l, 最小値は機関 A, C の 72 コピー/2 μ l, 平均 3,028 コピー/2 μ l, 中央値 1,422 コピー/2 μ l となった.

従来から使用の旧陽性コントロール(8 機関提供)については最大値は機関 B の 4,100 コピー/2 μ l, 最小値は機関 C の 38 コピー/2 μ l, 平均 1,114 コピー/2 μ l, 中央値 487 コピー/2 μ l となった.

平均値, 中央値を比較すると新陽性コント

ロールのほうがより正確な試験結果となることが期待できるが, 機関 A, C など実測値が低い機関では, 実際の検査では定量値が大きくなる可能性が高いことが懸念される. 反対に機関 F については実際の検体の汚染度合いを低く見積もる可能性が高くなることが懸念された.

また, 機関 B については実際の検体を従来は正確に定量できていたが, 新陽性コントロールを用いている現在は従来よりも高めに定量している可能性が懸念された.

D. 考察

現在主に行われている食品からのウイルス遺伝子検出においては, 非常に少ないウイルスを検出し, 汚染の判定を行わなければならない状況にあり, 検査機関によって検査結果が大きく異なることがないよう検査の精度管理システムの構築は非常に重要な課題となっている.

精度管理の対象のひとつとして, 実際の検体検査(リアルタイム PCR)に用いる陽性コントロールの検査機関ごとのばらつきについて, デジタル PCR を用いて確認したところ, 検査機関により $2\log_{10}$ 程度の大きなばらつきがあることが明らかとなった.

これは同じ検体を検査しても機関によって検査結果が 100 倍程度異なる可能性がある現状が示されたものであり, 陽性コントロールの管理が検査の精度管理上非常に重要な管理点となることを示している.

陽性コントロールの精度確認法としては本報告のように各機関から陽性コントロールを

一カ所に集約し、同時に測定する方法が使用
試薬や機器の差がなく、もっとも客観的に判
定できる方法と考えられた。

デジタル PCR は陽性コントロールを用いる
ことなく検体に含まれる遺伝子のコピー数の
絶対定量が行えるとする定量方法であるが、
実際には陰性検体からもわずかながら陽性カ
ウントが生じるため、食品からのウイルス検
出のような微量測定に利用するのは現段階で
は困難である。しかし、陽性コントロールの検
定では 10^4 コピーという比較的高濃度の検
体を用いるため、実験でのばらつきは小さく
なり精度管理への利用に適していると考えら
れた。

E. 結論

- ・市販カキについて次世代シーケンサによる
NoV 遺伝子型の網羅的検出をおこなった。

- ・カキ中には同時に複数の遺伝子型の NoV が
含まれることが示された。

- ・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。

- ・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
つながることが期待できる。

- ・従来は困難であった NoV 関連食中毒や感
染性胃腸炎事例において、原因食品や感染ル
ート解明の科学的根拠を得る手段として網羅
的解析が応用できるとかんがえられた。

- ・HAV-JCT-2F, 1R-A のプライマーセットを用
いた PCR 断片より、HAV 遺伝子検出に用いる
陽性コントロールプラスミドを作成した。

- ・ISO/TS 15216-1:2013 に記載された NoV 代
替ウイルスである MeV のリアルタイム PCR お
よび感染性推定遺伝子検査法に対応する陽性
コントロールプラスミドを作成した。

- ・NoV 代替ウイルスである CB5 を用いた感染
性推定遺伝子検査法に対応する陽性コント
ールプラスミドを作成した。

- ・HAV 検出に関して約 670 塩基の長鎖断片を
検出するサイバークリーン検出系リアルタイ
ム PCR 法の条件を決定した。

- ・12 機関で利用している NoV 遺伝子検査の陽
性コントロールの検定を行った。

- ・2015 年に配布された新陽性コントロールは
旧陽性コントロールよりもより正確な検定結
果となった。

- ・新陽性コントロールであっても検定結果に
は機関によって最大 $2\log_{10}$ のばらつきが確認
された。

- ・食品からのウイルス検出検査の精度管理に
おいて、陽性コントロールの管理が非常に重
要な管理点であることが示された。

- ・デジタル PCR が検査の精度管理において、
陽性コントロールの検定に有用であることが
示された。

F. 研究発表

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. 検体採取日と検出遺伝子型

No	採取日	250base 以上のリード				200base 以上のリード			
		GI		GII		GI		GII	
		従来法	推定法	従来法	推定法	従来法	推定法	従来法	推定法
1	11月4日								
2									
3									
4									
5	11月9日								
6									
7				3				3	
8	11月16日								
9				3				3	
10									
11				3,14				3, 14	
12									
13									
14	11月25日								
15		16				5, 16			
16									
17									
18				3, 14				3, 4, 14	
19			4, 5, 16	3, 4, 14	3, 4, 14		4, 5, 16	3, 4, 14	3, 4, 14
20	11月30日								
21									
22									
23									
24									
25					17				17

表 2 陽性検体からの検出遺伝子型とリード数(250base 以上のリード)

検体番号	GI				GII			
	従来法	リード数	推定法	リード数	従来法	リード数	推定法	リード数
7					GII. 3	5, 379		
9					GII. 3	65, 534		
11					GII. 3	33, 255		
					GII. 14	1		
15	GII. 16	65, 534						
18					GII. 3	64, 694		
					GII. 14	2		
19			GI. 4	44	GII. 3	49, 373	GII. 3	5
			GI. 5	110	GII. 4	547	GII. 4	23, 831
			GII. 16	1	GII. 14	5, 056	GII. 14	1
			該当なし	224	該当なし	47		
25				GII. 17	40, 470			

表 3 各ウイルス特異的プライマー

表. 陽性コントロールプラスミド作成に用いたプライマー

virus	primer	配列	strand
HAV	HAV-JCT-2F	GRAGAACAGGRAAYATTCARATTAG	+
	HAV-JCT-1R-A	YTTTRTCATCYTTTCAATTTCTGTCCA	-
	HAV-JCT-2R	CAGTHARMACHCCAGCATCCAT	-
HAV FLAG挿入用	HAV+3127FLAG+3148	GATT GAC TAC AAG GAT GAC GAT GAC AAG GGAGGTTGCCAAACAAAG	+
	HAV-3135FLAG-3113	CCTCC CTT GTC ATC GTC ATC CTT GAT GTC AATCTCAATTCCTTATA	-
CB5	CoxB5 +3609	TCTGAGCCAGGCGACTGTGG	+
	CoxB5 -4837	GACATGGGCATGTTGATCTTACC	-
MeV	Mengo+16-35	TGGGAGATCCGGATTGC	+
	Mengo-629-607	TACCTTCTGGGCATCCTTCAGC	-
	Mengo FW 4176-4197	ATAGCAGTGATGCATCCGGACC	+
	Mengo RV 5777-5797	CAGTCAGACTCTGCCATGTG	-

```

HAV_Flag      --TCCGGAGCATTGGATGGACTTGGAGACAAAAGTATTCAACTTTTGGACTTGTTCCTCA 58
KRM238G      TTCGGAGCATTGGATGGACTTGGAGACAAAAGTATTCAACTTTTGGACTTGTTCCTCA 360
              *****

HAV_Flag      TTCAAATTGCAAATTACGATCATTCTGATGAGTATTTGTCTTTAGTTGTTATTTGTCTG 118
KRM238G      TTCAAATTGCAAATTACGATCATTCTGATGAGTATTTGTCTTTAGTTGTTATTTGTCTG 420
              *****

HAV_Flag      TGACTGAACAGTCTGAGTTTTATTTTCTAGGGCACCTTTGAACACCAATGCTATGATGT 178
KRM238G      TGACTGAACAGTCTGAGTTTTATTTTCTAGGGCACCTTTGAACACCAATGCTATGATGT 480
              *****

HAV_Flag      CATCTGAAACAATGCTAGATAGAATGCTCTTGGTGATCTTGAATCTTCAGTTGATGATC 238
KRM238G      CATCTGAAACAATGCTAGATAGAATGCTCTTGGTGATCTTGAATCTTCAGTTGATGATC 540
              *****

HAV_Flag      CTCGGTCTGAAGAAGATCGAAAATTTGAAAGTCACATTGAGAAGAGAAAACCTATAAGG 298
KRM238G      CTCGGTCTGAAGAAGATCGAAAATTTGAAAGTCACATTGAGAAGAGAAAACCTATAAGG 600
              *****

HAV_Flag      AATTGATTTGACATCAAGGATGACGATGACAAGGGAGCTTGGCAACAAGATTAAAGT 358
KRM238G      AATTGATTTG-----GAGCTTGGCAACAAGATTAAAGT 636
              *****

HAV_Flag      ATGCTCAAGAAGAACTGTCAAATGAAGTGTTCCTCCTCCTCGAAAATCAAGGGTGTGT 418
KRM238G      ATGCTCAAGAAGAACTGTCAAATGAAGTGTTCCTCCTCCTCGAAAATCAAGGGTGTGT 696
              *****

HAV_Flag      TCTACAAGCAAAAATTTCACTGTTTTATACAGAGGACCATGAAATAATGAAGTTTCTT 478
KRM238G      TCTACAAGCAAAAATTTCACTGTTTTATACAGAGGACCATGAAATAATGAAGTTTCTT 756
              *****

HAV_Flag      GGAAGGAATTAAGTCTGACTAGAGCTCTGAGGATTTGGGTTTTCTTTAGCTGCTG 538
KRM238G      GGAAGGAATTAAGTCTGACTAGAGCTCTGAGGATTTGGGTTTTCTTTAGCTGCTG 816
              *****

HAV_Flag      GCAGAAGTGTGGACATTAGAAATGGATGCTGGTGTTTAACTGGAAGATTGGTGAGAG 598
KRM238G      GCAGAAGTGTGGACATTAGAAATGGATGCTGGTGTTTAACTGGAAGATTGGTGAGAG 876
              *****

HAV_Flag      TTAATGATGAGAAATGGACAGAAATGAAAGATGACAA----- 635
KRM238G      TTAATGATGAGAAATGGACAGAAATGAAAGATGATAAAATTGTTTCTCTGGTAGAAAAGT 936
              *****
    
```

図 1 : HAV 陽性コントロールプラスミドの塩基配列確認

上段 FLAG 配列挿入した HAV, 下段 FLAG 配列挿入前の HAV クローン
 線で囲んだ部分に FLAG 配列の挿入が確認できた。

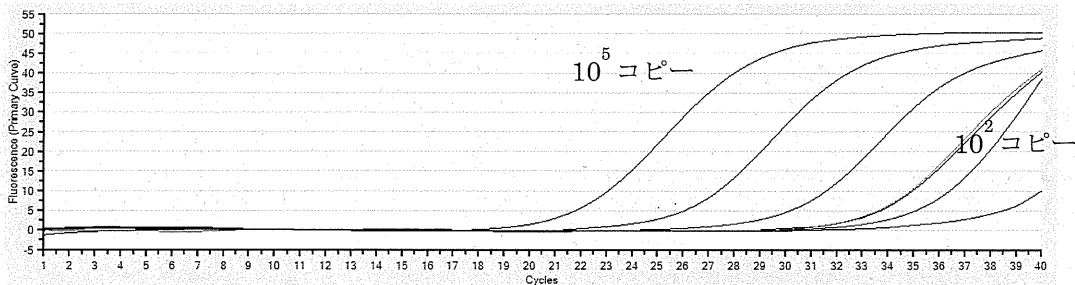
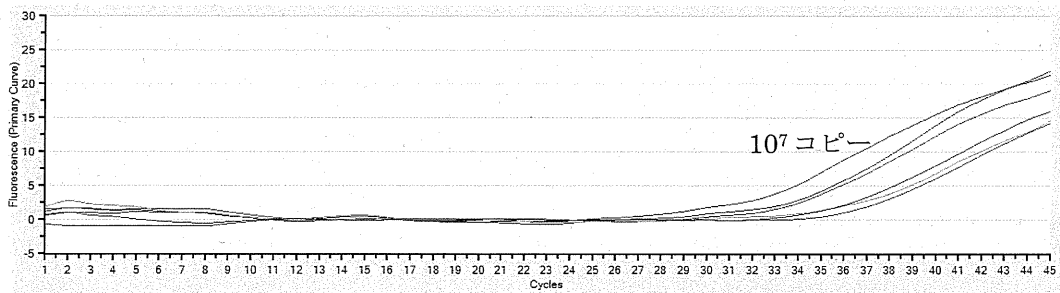


図2 リアルタイム PCR のステップサイクルの比較 上段2ステップサイクルによる増幅曲線 10^7 コピーから 10^4 コピーまでの希釈列を用いたが、いずれも30サイクル以降に増幅曲線が立ち上がり、コピー数の分解能が低い。下段 10^5 から 10^2 コピーまでよく分解しリアルタイム PCR の系として利用可能である。下段赤線がネガティブコントロールの検出線。

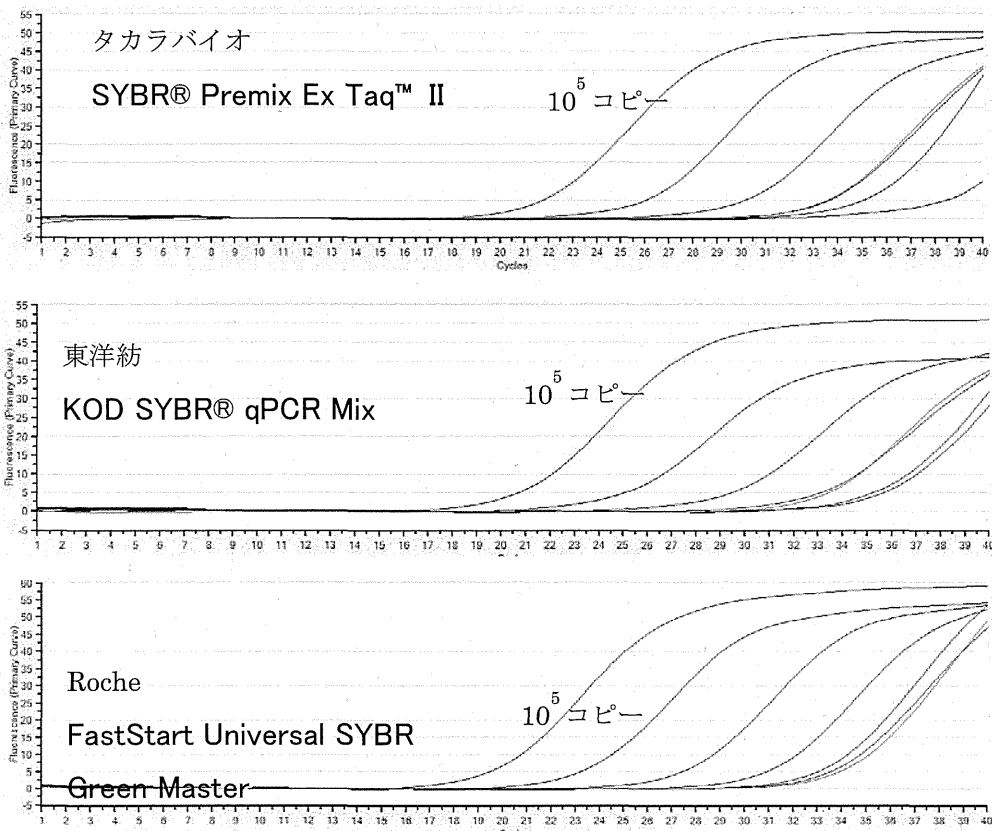


図3 タカラバイオ，東洋紡，Roche 社のリアルタイム PCR 試薬の比較
 3社の試薬で検出感度等に大きな差は見られず，同等の性能であることが示唆された。
 赤線がネガティブコントロールの検出線。

表 4. デジタル PCR の測定範囲の検討

Sample	コピー数/2ul	陽性	陰性	合計カウント
10 ³ -1	724	394	12595	12989
10 ³ -2	736	473	14876	15349
10 ³ -3	844	580	15865	16445
10 ³ -4	710	483	15770	16253
10 ³ -5	796	525	15239	15764
10 ³ -6	814	548	15586	16134
10 ³ -7	766	479	14460	14939
10 ³ -8	670	453	15683	16136
10 ⁴ -1	7620	4565	11922	16487
10 ⁴ -2	7180	4321	12122	16443
10 ⁴ -3	7320	4604	12613	17217
10 ⁴ -4	6160	3943	13157	17100
10 ⁴ -5	7660	4594	11936	16530
10 ⁴ -6	7100	4133	11743	15876
10 ⁴ -7	7540	4773	12642	17415
10 ⁴ -8	7020	4298	12378	16676
10 ⁵ -1	52800	14343	1705	16048
10 ⁵ -2	65000	15210	1021	16231
10 ⁵ -3	58000	14217	1322	15539
DW	11	8	17142	17150

表 5 12 機関で実際に利用している陽性コントロール(10^4 コピー/5 μ l)の定量結果

	機関	コピー数/2 μ l	
国衛研	N	2684	
新しいPC	A	72	平均 3,028 中央値 1,422
	B	1568	
	C	72	
	D	714	
	E	382	
	F	22360	
	G	1422	
	I	686	
	J	1924	
	K	2180	
	L	1928	
古いPC	A	76	平均 1,114 中央値 487
	B	4100	
	C	38	
	D	362	
	E	612	
	F	1504	
	G	1916	
	H	304	

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」

総合研究協力報告(平成 25～27 年度)

(研究協力報告総括)

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

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	吉澄 志磨	北海道立衛生研究所
	佐藤 直人	岩手県環境保健研究センター
	重本 直樹	広島県立総合技術研究所保健環境センター
	田村 務	新潟県保健環境科学研究所
	山本 美和子	広島市衛生研究所
	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
	吉富 秀亮	福岡県保健環境研究所
	吉岡 健太	熊本県保健環境科学研究所
	筒井 理華	青森県環境保健センター
	入谷 展弘	大阪市立環境科学研究所
	小林 慎一	愛知県衛生研究所

研究要旨

カキの食品媒介性ウイルスの汚染状況および検査法の問題点の把握等を目的として、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を対象に、食品媒介ウイルスの検出を試みた。ノロウイルスは 75.4% (138/183)、サポウイルスは 20% (130/148) のロットから検出され、A 型肝炎ウイルスおよび E 型肝炎ウイルスは陰性(それぞれ 128, 100 ロット検査)であった。加熱調理用カキは生食用カキと比較してノロウイルスの検出率、定量値とも高い値を示した。ノロウイルスの検出率や汚染量はカキの産地により大きく異なった。検出されたノロウイルスの遺伝子型はヒトでの流行を反映したが、ヒトからの検出が少ないにも関わらずカキから比較的多く検出される遺伝子型も認められた。また、2015 年の GII.17 のように、ノロウイルスの遺伝子型によっては、カキへのウイルスの蓄積が、その後の患者や食中毒事件の多発に関連する可能性が示唆された。リアルタイム PCR 法では、現状の陽性基準(2 ウェルとも実測値 10 コピー以上)に従うと、偽陰性と判定される割合が少なくないことが示された。

なお、本研究の詳細については、各研究協力報告に取りまとめられている。

A. 研究目的

ノロウイルスの汚染リスクのある食品

は二枚貝であり、とりわけカキは生食用として販売されていることから、食中毒の原因となる場合が多い。現在、カキのノロウイルスの検査は厚生労働省から示されている通知法で実施される場合が多いと推定される。しかし、通知法では、検査感度が十分ではないことから、検査法の改良等が行われている。これまで、カキのウイルス汚染率に関して多くの報告があるが、改良された試験法での汚染実態調査はあまり実施されていない。また、現在、リアルタイム PCR 法における陽性基準は実測値 10 コピー数以上とされているが、汚染量が少ない場合、陰性と判定される可能性がある。

一方、カキにはヒトで流行したウイルスが蓄積されることから、カキから検出されたウイルスの遺伝子型を調べることで、下水と同様にヒトで流行した遺伝子型を把握することができると考えられる。

そこで、改良された試験法を用いてのカキの食品媒介ウイルスの汚染状況の把握、検査法における問題点の把握、検出ウイルスの遺伝子型を特定し、ヒトの流行との関連性を明らかにすることなどを目的として、2013 年、2014 年、2015 年の 2 月上旬を中心に、全国 11 自治体で市販カキを採取し、代表的な食品媒介ウイルスであるノロウイルス、サポウイルス、A 型肝炎ウイルスおよび E 型肝炎ウイルスの検出を試みるとともに遺伝子型別を実施した。

なお、検査機関ごとの調査結果については、各研究協力報告を参考にさせていただきたい。

B. 研究方法

1. 材料

2013 年、2014 年及び 2015 年の 2 月上旬（一部は 1 月後半）に全国 11 自治体で購入した国産の市販生カキ 183 ロット 579 検体を検査材料とした。供試カキは 7（便宜的に、養殖海域を都道府県別にまとめ、A～G と表記）の産地のものであった。原則として 1 ロット（パック）につき、中腸腺 1.5～2.0g を 1 検体として、3 検体を検査に用いた。

2. 検査対象ウイルスおよび検査方法

ノロウイルスを中心として、サポウイルス、A 型肝炎ウイルス、E 型肝炎ウイルス等について検査した。

検査方法は、カキの前処理については、「食品のウイルス標準試験法検討委員会」のホームページに記載されている「二枚貝（カキ）からのウイルスの濃縮法」（http://www.nihs.go.jp/fhm/csvdf/kentest/csvdf001_wg_100820.pdf）を基本とした方法（一部改変）で実施した。

濃縮材料からの RNA 抽出、DNase 処理および逆転写反応も同ホームページに掲載されている、「濃縮材料からのウイルス RNA の抽出・DNase 処理・逆転写反応」（http://www.nihs.go.jp/fhm/csvdf/kentest/csvdf002_wg_100820.pdf）を基本とした方法（一部改変）で実施した。各検査対象ウイルスの遺伝子検出は、リアルタイム PCR 法または nested PCR 法で行った。

Nested PCR 法でウイルスが検出された場合、ダイレクトシーケンス法で塩基配列を決定後、系統樹を作成し、遺伝子型を決定した。ノロウイルスの遺伝子型は新遺伝子型別法に従った。サポウイル

スの遺伝子型別は岡らの分類法に従った。一部の株については、クローニング後各クローンの塩基配列を決定した。

(検査法の詳細については、各研究協力者の研究協力報告を参照)

(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. 市販カキ等からのウイルスの検出状況

(1) 各食品媒介ウイルスの検出状況

ノロウイルスは市販カキ 183 ロット中 138 ロット (75.4%)、579 検体中 345 検体 (59.6%) から検出された(表 1・2, 図 1・2)。

サポウイルスは 148 ロット中 30 ロット (20.3%)、471 検体中 50 検体 (10.6%) から検出された。

A型肝炎ウイルスは 128 ロット 411 検体、E型肝炎ウイルスは 100 ロット 341 検体について検査したが、いずれも陰性であった。

ノロウイルスの年次別の検出率は概ね同様の傾向を示したが、サポウイルスについては年により検出率が変化する傾向にあった(ロット別: 14.3%~26.5%, 検体別: 4.8%~19.1%)。

(2) 生食用カキと加熱調理用カキのウイルス検出率および定量値の比較

生食用カキと加熱調理用カキの検出率をロット別に比較すると、ノロウイルス GI が加熱調理用 62.0%(44/71)、生食用 33.3%(37/111)、GII が加熱調理用

87.3%(62/71)、生食用 64.9%(72/111)、サポウイルスが加熱調理用 26.3%(15/57)、生食用 16.5%(15/91)、検体別に比較すると、ノロウイルス GI が加熱調理用 37.8%(84/222)、生食用 17.8%(63/354)、GII が加熱調理用 74.8%(166/222)、生食用 44.6%(158/354)、サポウイルスが加熱調理用 17.0%(31/182)、生食用 6.6%(19/289)で、いずれも加熱調理用カキの検出率が高い値を示した。

ノロウイルスの検出率を年次別にみると、概ね毎年同程度の検出率を示したが、2015年2月採取の生食用カキの GII 検出率(ロット別検出率: 75.7%)は、2013年(58.1%)、2014年(60.5%)の結果と比較すると高い傾向が認められた。

ノロウイルスのリアルタイム PCR 法で定量値が得られたもの(実測値 10 未満のデータを含む)となった検体の定量値の算術平均値をみると(表 11, 図 11)、GI では加熱調理用 334 コピー/g、生食用 211 コピー/g、GII では加熱調理用 5813 コピー/g、生食用 2029 コピー/g で、検出率と同様に加熱調理用カキの定量値が高い値を示した。また、2015年2月採取の生食用カキの定量値(3414 コピー数/g)の算術平均値は、検出率と同様に過去2年(2013年: 1058 コピー数/g、2014年: 789 コピー数/g)の値と比較すると、高い傾向にあった。

一方、ノロウイルス GI と GII の定量値の算術平均値(3年の合計)を比較すると、GII が GI の約 10 倍~17 倍程度高い値を示した。

(3) 産地別のウイルス検出率の比較

産地別のノロウイルス検出率をロット

別にみると、GI(表 5, 図 5)は加熱調理用 0%~68.9%, 生食用 8.3%~53.7%, GII(表 7, 図 7)は加熱調理用 0%~100%, 生食用が 41.7%~87.8%に分布し、検体数に違いがあるものの、産地により検出率は大きく異なった。

検体別でも、GI は加熱調理用 0%~46.5%, 生食用が 2.4%~28.9%, GII は加熱調理用 0%~88.9%, 生食用 19.0%~71.1%に分布し、産地により検出率に違いが認められた。

サポウイルスの産地別検出率はロット別にみると 0%~50.0%, 検体別にみると 0%~44.7%に分布し、年次及び産地ごとに検出率が変動する傾向にあった。

ノロウイルスのリアルタイム PCR 法で定量値が得られた(実測値 10 未満のデータを含む)ものについて、定量値の算術平均値を産地別にみると、産地 A の GII 定量値が加熱調理用カキ、生食用カキともに、他の産地のものと比較すると高い傾向にあった(表 12, 図 12)。産地 F の加熱調理用カキも比較的高い定量値を示した。

2. 市販カキから検出されたノロウイルス遺伝子型とヒト由来ノロウイルス遺伝子型との比較

3 年間の調査で 488 株の検出ノロウイルスが遺伝子型別され、GI(130 株)が 9 種類(旧遺伝子型分類で GI/12, 新遺伝子型分類で NA となる株を含む), GII(357 株)が 10 種類に分類された(表 13, 図 13)。主要遺伝子型は採取年により異なり、2013 年 2 月および 2014 年 2 月の採取カキでは GII. 4 がそれぞれ 43%, 36%を占めた。一方、2015 年 2 月採取カキでは

GII. 17 が最も多く、46%を占めた。カキから検出されたノロウイルスの遺伝子型を国立感染症研究所感染症疫学センターが集計している病原微生物検出情報によるヒトから検出されたノロウイルスの遺伝子型(2012/13, 2013/14 及び 2014/15 の各シーズンの 11 月から翌年 1 月までの報告数を集計したもの)と比較すると、同期間にヒトから検出されたノロウイルスの遺伝子型の多くはカキから検出された。一方、ヒトからの検出が少ないか(2012/13 シーズンの GII. 13, 2013/14 シーズンの GI. 4, GII. 13, 2014/15 シーズンの GI. 2 等),あるいは、ヒトから検出されていない遺伝子型(2013/14 シーズンの GI. 3, 2014/15 シーズンの GI. 4, GII. 21 等)で、カキからは比較的多く検出される遺伝子型も認められた。

3 シーズンにおいて、本調査により市販カキから検出されたノロウイルスの遺伝子型とヒト(病原微生物検出情報によるヒトから検出されたノロウイルスの遺伝子型(2012/13, 2013/14 及び 2014/15 の各シーズンの 11 月から翌年 1 月までの報告数を集計したもの)から検出された遺伝子型について、市販カキとヒトの両者から検出されたもの、市販カキのみから検出されたものおよびヒトのみから検出されたものの割合をノロウイルス GI と GII に区分して比較した(図 14)。GI では市販カキとヒトから検出されたものが 52.4%, カキのみから検出されたものが 42.9%, ヒトのみから検出されたものが 4.8%, GII ではそれぞれ 57.1%, 21.4%, 21.4%で、GI はカキのみから検出される傾向が高く、GII ではカキとヒトの両者か

ら検出される割合が高かった。

次に、2012/13 から 2014/15 の 3 シーズンにおいて 11 月から翌 3 月にヒトから検出されたノロウイルス遺伝子型の検出割合を月別に集計し、市販カキから検出されたノロウイルス遺伝子型の検出割合を比較した (図 15)。GII. 4 は 3 シーズンともほぼ 11 月から翌 1 月にかけてヒト由来ノロウイルスにおいて多くの割合を占め、市販カキからも 2015 年を除き、最も多く検出されたが、2 月以降は検出割合が低下する傾向にあった。一方、2012/13 シーズンの GI. 6, GII. 14, 2013/14 シーズンの GI. 3, GII. 6, 2014/15 シーズンの GI. 2, GII. 17 のように、11 月から翌 1 月まではヒトからの検出割合が少ないか未検出であったが、2 月採取の市販カキから検出され、2 月あるいは 2 月から 3 月にかけてヒトからの検出割合が増加する遺伝子型が認められた。

3. リアルタイム PCR 法と nested PCR 法の比較

リアルタイム PCR 法による定量値と nested PCR 法の結果を比較した結果、リアルタイム PCR 法で 10 以上の定量値を示したものは、nested PCR 法で 90.6%以上が陽性となり、また、リアルタイム PCR 法で陰性 (定量値が得られないもの) の 78.2%以上は nested PCR 法で陰性となり、両者の結果は概ね一致した (表 14, 図 16)。一方、リアルタイム PCR 法で実測値 10 未満の定量値が得られた検体については、nested PCR 法で、全体で GI は 62.1%, GII は 69.1%が、nested PCR 法で陽性となった。また、リアルタイム PCR 法で実測値 10 未満の定量値が得られた検体について

加熱調理用カキと生食用カキに区分してみると、GI および GII ともに、加熱調理用が nested PCR 法で陽性となる割合が高く、生食用が nested PCR 法で陰性となる割合が高かった。

D. 考察

2013 年から 2015 年の各 2 月上旬を中心に全国 11 自治体において、市販カキを購入し、食品媒介ウイルスの汚染状況を把握するとともに、カキのウイルス検査の問題点等について調査した。以下、その主要な点について取りまとめ、考察を加えた。

1. カキの食品媒介ウイルス汚染状況

今回の調査結果から、市販カキの約 75% のロット、約 60%の検体からノロウイルスが検出され、市販カキの多くがノロウイルスに汚染されていることが明らかになった。今回の調査は、ノロウイルスの流行期である 2 月に採取されたカキを対象としていることから、一般的なカキのノロウイルス汚染率とは言えないが、流行期の市販カキのノロウイルス汚染率は低いものと考えられる。今後、異なる時期に採取されたカキを含め、データの蓄積を図る必要がある。

サポウイルスは約 20%のロット、約 10%の検体から検出された。

一方、A 型肝炎ウイルスおよび E 型肝炎ウイルスは検査数は少ないものの、全て陰性であった。このことから、市販カキにおける両ウイルスの汚染リスクは高いものと考えられる。しかしながら、平成 26 年度の報告書に記載されているように、下水から A 型肝炎ウイルスが検出