

いないが増幅曲線が確認された検体の cDNA について、カプシド領域のプライマーを用いた 1stPCR を行った後、Nested real-time PCR 法を実施した。

3. 破碎法の検討

細胞破碎法の破碎条件を検討した。さらに、細胞破碎法と proteinaseK (PK) 及び α -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を用い、カキから NoV 遺伝子を定量的に検出し比較した。

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

市販カキ 894 個体について、Real-time PCR 法で NoV 遺伝子検出検査を実施した結果、10 コピー未満で増幅曲線が確認された検体が 256 個体あった。それらについて Nested real-time PCR 法を実施した結果、73 個体 (28.5%) で NoV 遺伝子の特異的な増幅を認めた (図 1)。Nested real-time PCR 法で陽性となった検体の Real-time PCR 法での平均実測値は約 2.6 コピー (SD=3.5)、陰性となった検体では約 1.3 コピー (SD=2.0) であったが、有意な差は認められなかった。

2. 破碎法の検討

抽出液として滅菌蒸留水 (以下 DDW) を使用した場合の最適破碎条件は、従来実施していた条件よりも緩和な 3,500rpm・15 秒が最も検出率が高かった。酵素処理

を導入した場合は、AM 液を使用しカキ中腸腺を 4500rpm, 15 秒で細胞破碎後、37°C 1 時間の加温する方法が、未処理、PK 処理と比較して検出率および遺伝子定量値ともに高く、最も高感度であった。

D. 考察

通知法の陽性基準を満たしていないが増幅曲線が確認されたカキ 256 個体中 73 個体 (28.5%) から Nested real-time PCR 法によって特異的な増幅曲線が確認された。また、Nested real-time PCR 法の遺伝子検出検体と陰性検体の Real-time PCR 法での平均実測値に有意差が認められなかったことから、NoV 濃度が低い検体を対象とした、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、陽性検体が看過される可能性があることが示された。すなわち、NoV による感染性胃腸炎・食中毒患者の糞便や冬季の流入下水など NoV 濃度が高い検体を対象とした場合には Real-time PCR 法による遺伝子検出検査は非常に有効であるが、カキなど NoV 濃度が低い検体を対象とした場合において、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ことが本研究より示唆された。

破碎法において、AM 液を使用しカキ中腸腺を 4,500rpm, 15 秒で細胞破碎後、37°C 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。本法はカキの迅速・簡便な前処理法として有用であると思われる。

E. 結論

通知法である NoV 定量 PCR 法の陽性基準を適用して判断した場合、本来陽性である検体が陰性として扱われ、場合によっては健康被害につながるものが危惧される。NoV 濃度が低いと考えられるカキなどの食品を対象とした検査では特に、陽性基準値である 10 コピー未満の検体であっても、増幅曲線が認められる場合には、Nested PCR 法や Nested real-Time PCR 法による再検査が必要である。

破碎法において、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確認された。

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

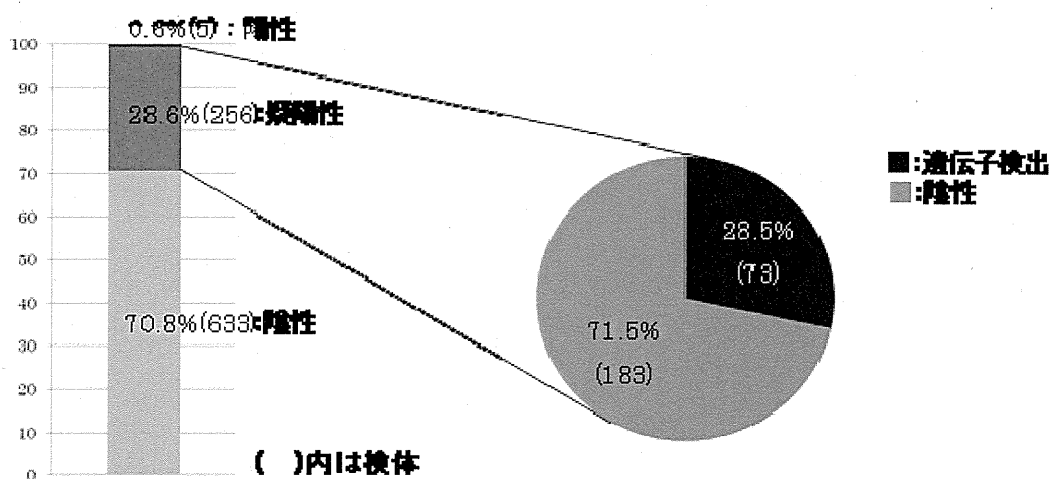


図1 通知法による NoV 遺伝子検出結果(左) 及び Nested real-time PCR 法による結果(右)

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

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

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

2013 年から 2015 年の、ノロウイルスの流行期にあたる各年の 2 月に市販されていた、生食用カキ 8 ロット、加熱用カキ 11 ロット計 19 ロットの生カキを購入し、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。

リアルタイム PCR 法によるノロウイルスの定量では、1st リアルタイム PCR のため検出限界以下の検体が多く、GI ノロウイルス陽性と判定された検体は無かった。GII ノロウイルスでは、57 検体中 15 検体が陽性と判定された。中腸腺中のノロウイルスの量は、GI ノロウイルスは最大で 472 コピー/g、GII ノロウイルスは最大で 3428 コピー/g で、GII ノロウイルスの汚染量が多かった。

コンベンショナル 2nd PCR による検索では、生食用カキ 8 ロット 24 検体中、GI ノロウイルスは 3 ロット 5 検体 (38%)、GII ノロウイルスは 7 ロット 10 検体 (42%) から検出された。加熱用カキでは、11 ロット 33 検体中、GI ノロウイルスは 7 ロット 10 検体 (30%)、GII ノロウイルスは 11 ロット 30 検体 (91%) から検出された。ノロウイルスの遺伝子型別では、GI は GI. 1、GI. 2、GI. 3、GI. 4、GI. 9 が、それぞれ 1、5、2、6、1 件検出され、GII は、GII. 4 2006b、GII. 4 Sydney 2012、GII. 3、GII. 6、GII. 14、GII. 17 がそれぞれ、2、26、3、11、1、8 件検出された。なお、GII の PCR 増幅産物は複数型混合のものが 17 サンプルあり、このうち 14 サンプルからシーケンスプライマーを使用して遺伝子塩基配列を採取した。

このほか、サポウイルスが 5 検体から、アストロウイルスが 9 検体からアイチウイルスが 13 検体から検出されたが、A 型肝炎ウイルス、E 型肝炎ウイルスは検出されなかった。

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、従来 PEG 沈殿法が用いられてきたが、カキに含まれるグリコーゲンが PCR 反応を阻害することから、アミラーゼ処理が追加された方法が開発され、今回はこの新たな方法でカキからのウイルスの濃縮を行った。

また、カキからのウイルス遺伝子の検出では、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、ダイレクトシークエ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クエンス用プライマーを作製して、ダイレクトシークエンスで塩基配列データを得る方法を検討した。

これらの検討を行いながら、2013 年から 2015 年にかけて、感染性胃腸炎の流行

期の 2 月に市販されている生カキを購入し、ノロウイルス等胃腸炎ウイルス、及び肝炎ウイルスの汚染状況を調べた。

B. 研究方法

1. 材料

生カキ：新潟県内のスーパー等で、ノロウイルスの流行期にあたる 2 月に、2013 年は生食用カキ 2 ロット、加熱用カキ 4 ロット、2014 年は生食用カキ 3 ロット、加熱用カキ 3 ロット、2015 年は生食用カキ 3 ロット、加熱用カキ 4 ロット、計 19 ロットの生カキを購入し、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 個から 2 個を 1 検体とし、1 ロットあたり 3 検体を検索した。中腸腺を取り出して 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 沈殿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

リアルタイム PCR によるノロウイルス定量検出には、Random Primer と Oligo dt を用いた Highcapacity RNA-to-cDNA Kit (ABI) により逆転写を行い、ウイルスの遺伝子解析による型別には、特異性の高い Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) (以下、Transcriptor RT。)により逆転写を行った。

逆転写用プライマーと反応条件は表 1 のとおりとした。

4. 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。cDNA 量は $2.5\mu\text{l}$ とし、試薬を含む総量は $25\mu\text{l}$ の系で実施した。

標準プラスミドは、国立感染症研究所配布のものを用いたが、2013 年、2014 年に使用したプラスミド濃度と 2015 年に新たに配布され使用したプラスミド濃度が異なったことから、2013 年、2014 年の定量値を補正した。

4. コンベンショナル PCR によるウイルス遺伝子の検出

PCR は、表 1 のプライマーにより、Nested PCR 法で実施した。

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、Nested PCR 反応には、Takara Ex Taq HS (Takara)、あるいは AptaTaqFast PCR Master を使用して、PCR 反応を実施した。

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 により系統樹を作成し、遺伝子型別を実施した。

PCR 用プライマーでダイレクトシーク

エンスを実施し、Electropherogram が混合波形となったサンプルについては、シーケンス用プライマー (表 2) により、塩基配列データを採取した。

(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. ノロウイルスの定量試験結果 (表 3)

リアルタイム PCR 法によるノロウイルスの定量では、1st リアルタイム PCR のため検出限界以下の検体が多く、GI ノロウイルス陽性と判定された検体は無かった。

GII ノロウイルスでは、生食用で 24 検体中 3 検体、加熱用では 33 検体中 12 検体が陽性と判定された。中腸腺中のノロウイルスの量は、GI ノロウイルスは最大で 472 コピー/g、GII ノロウイルスは最大で 3428 コピー/g で、GII ノロウイルスの汚染量が多かった。

また、実測値 10 コピー以上の陽性判定の検体数は、GII ノロウイルスで生食用のカキが 24 検体中 3 検体、加熱用では 33 検体中 12 検体であった。実測値 10 コピー未満でも増幅がみられた検体数は、GII ノロウイルスでは生食用が 24 検体中 12 検体、加熱用では 33 検体中 28 検体と、加熱用で陽性検体数や増幅検体数が多かった。

2. ノロウイルスのコンベンショナル PCR 法による検出状況 (表 4)

コンベンショナル Nested 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。

検出率は、生食用カキ 8 ロット 24 検体中、GI ノロウイルスは 3 ロット (21%) 5 検体 (38%)、GII ノロウイルスは 7 ロット (88%) 10 検体 (42%) から検出された。加熱用カキでは、11 ロット 33 検体中、GI ノロウイルスは 7 ロット (64%) 10 検体 (30%)、GII ノロウイルスは 11 ロット (100%) 30 検体 (91%) から検出された。ノロウイルスの遺伝子型別では、GI は GI. 1、GI. 2、GI. 3、GI. 4、GI. 9 が、それぞれ 1、5、2、6、1 件検出され、GII は、GII. 4 2006b、GII. 4 Sydney 2012、GII. 3、GII. 6、GII. 14、GII. 17 がそれぞれ、2、26、3、11、1、8 件検出された。

なお、GII の PCR 増幅産物は複数型混合のものが 17 サンプルあり、このうち 14 サンプルからシーケンスプライマーを使用して遺伝子塩基配列を採取した。

3. 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 5)

サポウイルスは 3 シーズンのカキで検査したが、検出されたのは 2013 年と 2014 年のみで、検出された 5 検体はいずれも GI. 2 に型別された。アストロウイルス、アイチウイルスは、2014 年と 2015 年のカキで検索したところ、アストロウイルスは 2014 年 2 月のカキ 18 検体中 9 検体の半数から検出されたが、2015 年のカキからは検出されなかった。アイチウイルスは、2014 年、2015 年のカキからそれぞれ 8 件と 5 件検出され、主に遺伝子型 A が多

かった。

A 型肝炎ウイルス、E 型肝炎ウイルスは、全ての検体で検出されなかった。

4. リアルタイム PCR とコンベンショナル PCR の比較 (表 6)

リアルタイム PCR で、増幅がみられた検体 (検出下限値を下回るが増幅が確認できた検体を含む) とコンベンショナル PCR で増幅がみられた検体を比較した。

GI ノロウイルスでは、57 検体中 41 検体 (72%) の結果が一致し、GII ノロウイルスでは、57 検体中 37 検体 (65%) の結果が一致した。

GI では、リアルタイム PCR で増幅がみられた検体数がコンベンショナル PCR で増幅がみられた検体数を下回ったが、GII では同じであった。

D. 考察とまとめ

1 年によって検出される遺伝子型、ウイルスの種類が異なった。

2013 年、2014 年は、ノロウイルス GII. 4 Sydney 2012 が流行したためか、この型の検出が多かった。2014 年には GII. 6 が、2015 年には GII. 17 や GI. 2 が多く検出されており、市中の流行型により変動していると考えられた。

2 加熱用のカキのほうが生食用カキより汚染率は高く、汚染ウイルス量も多い傾向があった。

加熱用カキのほうが、生食用のカキより汚染の度合いが高く、従来の結果と同様であった。生食用であってもカキのノロウイルスの汚染が無いわけではないことから、カキは加熱して喫食することが

望まれる。

3 PCR産物に複数の型が混在する場合、型特異的な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できた。

PCR産物に複数の型が混合している場合、クローニング法により含まれる遺伝子を採取することが一般的である。しかし、食中毒事件の調査段階では、クローニングを実施する余裕が無いことから、いくつかのシーケンスプライマーを用意しておくことで、ある程度の塩基配列を採取できると考えられる。特に、流行型を把握して、シーケンスプライマーを準備しておくことは、今後の対応に必要と思われる。

4 リアルタイムPCR法による検出とコンベンショナルNested PCR法の比較では、一致率はGIで72%、GIIで65%であった。

リアルタイムPCR法の結果とコンベンショナルPCRの結果の差の原因としては、プライマーの反応性の差や手技のばらつきのほか、リアルタイムPCRが1stPCRの結果であることから、感度の影響もあると思われた。

確実な判定には、2ndリアルタイムPCR法で確認する必要があると思われた。

2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

E. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

なし。

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし

表1 RTとPCRで使したプライマーと逆転写反応の条件

対象ウイルス	逆転写用プライマー	逆転写反応条件	コンベンショナル PCRプライマー		出典
			1st PCR	Nested PCR	
ノロウイルスGI	PanR-GIa, GIb	58°C30~60min, 85°C5min	COG1F/G1SKR	G1SKF/G1SKR	RT Primer : Saitoら (Food. Environ. Virol. 7: 239-248, 2015)
ノロウイルスGII	PanR-GIIa, GIIf, GIIfc		COG2F/G2SKR	G2SKF/G2SKR	PCR : Kageyamaら (J. Clin. Microbiol. 41: 1548-1577, 2003)
サポウイルス	SV R13・SV R14	50°C30~60min, 85°C5min	SAV124F, 1F, 5F/SVR13, SVR14	124Rfwd/SVR2	Kitajimaら (App. Environ. Microbiol., 76: 2461-2467, 2010)
アストロウイルス	AC230		PreCap1/AC230	AC1/AC230	Sakonら (J. Med. Virol., 61: 125-131, 2000) 病原微生物検出マニュアル
アイチウイルス	C-		C+/C-	C94b/264k	Yamashitaら (J. Clin. Microbiol. 38:2955-2961, 2000)
A型肝炎ウイルス	1R-A		1F/1R-A	1F/2R	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	HEV R2		HEVF1/HEVR2	HEVF2/HEVR1	病原微生物検出マニュアル

表2 シークエンス用プライマー

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 goa 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	''

表3 リアルタイムPCR法によるノロウイルスの定量結果

2013					2014					2015							
採取県	海域	検体番号	GI (copy/g)	GII (copy/g)	採取県	海域	検体番号	GI (copy/g)	GII (copy/g)	採取県	海域	検体番号	GI (copy/g)	GII (copy/g)			
生 食 用	D	D1	1-1		D	D1	2-1		4	D	D1	2-1		46			
			1-2				2-2		2-2								
			1-3	27			2-3		2-3								
	D	D2	3-1		D	D99	1-1		134	D	D1	3-1					
			3-2	23			1-2	71	3-2								
			3-3	26			1-3	177	3-3			45					
	B	B9	3-1	5	60	C	C	1-1			C	C	1-1				
			3-2		354			1-2		1-2							
			3-3	15	78			1-3		1-3				陽性・増幅数合計			
平均		25					10	125					45	GI	GII		
		陽性数/検体数	0/6	0/6				0/9	3/9				0/9	0/9	0/24	3/24	
		増幅あり検体数/検体数	0/6	3/6				2/9	7/9				0/9	2/9	2/24	12/24	
加 熱 用	A	A20	6-1	47	A	A20	6-1			A	A20	4-1	40	223			
			6-2	176			18	6-2	48			4-2	189				
			6-3	18			6-3	472	727			4-3	304				
	A	A10	2-1	22	F	F1	4-1		664	F	F1	5-1		3428			
			2-2					4-2	859			5-2	1710				
			2-3	28			4-3	1001	5-3			68	1934				
	F	F1	4-1		212	F	F1	4-1		664	F	F1	6-1	52			
			4-2		128			4-2		859			6-2	74	56		
			4-3	82	4-3				1001	6-3			10				
	F	F1	5-1	53	5-1		959	F	F1	5-1		959	7-1	18	111		
			5-2	36	5-2	12	2479			7-2							
			5-3	50	5-3		1495			7-3		226	陽性・増幅数合計				
	平均		176	63				242	1029				44	909	GI	GII	
			陽性数/検体数	0/12	2/12				0/9	7/9				0/12	3/12	0/33	12/24
			増幅あり検体数/検体数	1/12	11/12				2/9	8/9				6/12	9/12	9/33	28/33

※太字は陽性と判定されたものを示す。

表 4 その他の胃腸炎ウイルスの検出と遺伝子型別結果

採取年	生食/ 加熱別	採取 県	海域	検体 番号	サポ ウイルス	アストロ ウイルス	アイチ ウイルス
2013	生食用	D	D1	1-1			
				1-2			
				1-3			
		D	D2	3-1			
				3-2			
				3-3			
	加熱用	A	A20	6-1			
				6-2			
				6-3	GI-2		
		A	A10	2-1	GI-2		
				2-2			
				2-3			
		F	F1	4-1			
				4-2			
				4-3	GI-2		
F	F1	5-1					
		5-2					
		5-3					
2014	生食用	D	D1	2-1			
				2-2			
				2-3	Ast 1		
		D	D99	1-1			G-A
				1-2			G-A
				1-3	GI-2		G-A
	加熱用	B	B9	3-1			
				3-2			
				3-3			
		A	A20	6-1		Ast 1	
				6-2			
				6-3	GI-2	Ast 1	G-A
		F	F1	4-1		Ast 1	
				4-2		Ast 1	G-A
				4-3		Ast 1	Canine Kobu
F	F1	5-1		Ast 1	G-A		
		5-2		Ast 1	G-A		
		5-3		Ast 1			
2015	生食用	D	D1	2-1			
				2-2			
				2-3			
		D	D1	3-1			
				3-2			
				3-3			
	加熱用	C	C	1-1			
				1-2			
				1-3			
		A	A20	4-1			G-A
				4-2			G-B
				4-3			
		A	A	5-1			G-A
				5-2			G-A
				5-3			G-A
F	F1	6-1					
		6-2					
		6-3					
F	F1	7-1					
		7-2					
		7-3					
合計				5	9	13	
生食用	陽性	1/24	1/18	3/18			
加熱用	検体数	4/33	8/21	10/18			
生食用	陽性	1/8	1/6	1/6			
加熱用	ロット数	4/11	3/7	5/7			

表5 リアルタイム PCR とコンベンショナル PCR の結果の比較

GI ノロウイルス	リアルタイム PCR増幅 (+)	リアルタイム PCR増幅 (-)	GIII ノロウイルス	リアルタイム PCR増幅 (+)	リアルタイム PCR増幅 (-)
コンベンショナル 2nd PCR 増幅(+)	5	10	コンベンショナル 2nd PCR 増幅(+)	30	10
コンベンショナル 2nd PCR 増幅(-)	6	36	コンベンショナル 2nd PCR 増幅(-)	10	7

※表中の数値は、検体数を示す。

リアルタイム PCR の増幅は、実測値 10 コピー未満での増幅も含む。

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)

ウイルス性胃腸炎の発生予防に関する検討

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	東京都健康安全研究センター
研究協力者	木本 佳那	東京都健康安全研究センター
研究協力者	林 志直	東京都健康安全研究センター
研究協力者	秋場 哲哉	東京都健康安全研究センター

研究要旨

ウイルスに起因する集団胃腸炎事例は大きな割合をしめており、その発生予防および拡大防止策の構築がもとめられている。そこで、ノロウイルスに次ぐ事例の発生がみられるサポウイルスについて検出事例から発生要因を検索したほか、検査の高感度化を目的とした SPIA 法の評価、および感染性粒子推定遺伝子検索法を用いた検出ウイルスの感染性について検討を実施した。検討の結果、サポウイルスによる集団事例はノロウイルスと同一の要因で発生していることが確認できたことから、ノロウイルス同様に予防対策をとることが必要であると思われた。SPIA 法を用いることにより検査の高感度化ははか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となることが推察された。感染性粒子推定遺伝子検索法を用いて発症者およびウイルスの検出された調理従事者について比較を実施したところ、感染性をもつと推定されるウイルス粒子の割合は両群で有意差が認められなかった。この結果から、ウイルスが検出された調理従事者は確実に調理作業への従事を制限すべきであることが拡大防止に重要であると思われた。

A. 研究目的

食中毒事例をはじめとした集団胃腸炎事例はウイルスに起因するものが大きな割合を占めている。そこで、その発生予防および拡大防止策に関連し、ノロウイルスに次ぐ事例数を占めるサポウイルス

(SaV) に関する検討、検査手法の高感度化に関する検討、および検出されるウイルス遺伝子の感染性についての検討を実施した。

B. 研究方法

1. 材料

当センターにウイルス性胃腸炎の検査を目的として搬入された糞便試料、マウスノロウイルス (MNV) 培養上清、およびカキ乳剤を供試材料とした。

2. SaV 関連胃腸炎に関する検討

2013 年に SaV の検出された集団胃腸炎事例における推定原因食品の検索や検出ウイルスの遺伝子型別、不顕性感染者における遺伝子量の測定を実施した。

3. SPIA 法を用いた高感度化に関する検討

逆転写反応時に cDNA を増幅する SPIA 法を用い、実際の検査に応用可能か検討を実施した。

4. 検出ウイルスの感染性に関する検討

感染性粒子推定遺伝子検査法を用い、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. SaV 関連胃腸炎に関する検討

糞便試料から検出された SaV の塩基配列は 20 事例中 17 事例が GI.2 に型別された。その他は GII.3 が 2 事例、GI.1、GII.1、GII.3 がそれぞれ 1 事例であった。これら SaV 検出事例は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、NoV

と同様に両群に有意差が認められなかった (図 1)。

2. SPIA 法を用いた高感度化に関する検討

random primer により合成した MNV 培養上清由来の cDNA 希釈列の定量値より、SPIA 反応を用いた cDNA は検出値が向上した (図 2)。カキ乳剤における検討において、amylase による前処理と SPIA 法を組み合わせた場合の検出値がもっとも高値であったが、amylase による前処理なしで RNA を抽出した場合、SPIA 法による検出値は random primer を用いた検出値より低値であった (図 3)。

3. 検出ウイルスの感染性に関する検討

感染性粒子の量と推定される測定値 (FCV による補正後) は、発症者で $0.1 \sim 1.0 \times 10^7$ (copies/ μ L)、調理従事者で $0.2 \sim 4.7 \times 10^6$ (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。また、対照試験の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 4)。

D. 考察

2013 年 2 月～5 月にかけてみられた SaV の関与した胃腸炎事例は GI.2 が検出型の多くをしめ、SaVGI.2 の大きな流行が推察された。塩基配列が既知の株の SaVGI.2 もあわせて VP1 領域のアラインメントをとると、NoV 同様に時間経過にともないアミノ酸変異を繰り返しつつ現在に至っていることが確認できた。SaV 検出事例は、NoV 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ていた。また、NoV 同様に糞便中

の SaV 量は発症者群と不顕性感染者の間に有意差はみられなかった。これらの結果から SaV の感染要因は NoV と同一であることが確認できた。

得られた結果から、SPIA 法は反応における阻害物質の存在が大きく影響すると思われた。そのため本反応系は試料に含まれる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、カキ乳剤における検討結果が示すように、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。

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。したがって、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

・ SaV においても NoV 同様に不顕性感染者糞便中に含まれるウイルス遺伝子量に有意差が認められなかった。

・ SaV 関連胃腸炎の発生状況から、発生の要因は NoV と同一であることが確認できた。

・ 逆転写反応の際に SPIA 法を導入することにより検出値が高値となるが、本法は

阻害物質の影響が大きく、適切な前処理方法を選択することが必要と思われた。

・ 検出された NoV に占める感染性粒子の割合は、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：東京都において集団胃腸炎事例から検出された Sapovirus について、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013、神戸市

・ 森功次ほか：ウイルス性胃腸炎検査における SPIA (Single Primer Isothermal Amplification) 法導入に関する検討、第 35 回日本食品微生物学会学術総会、2014、堺市

・ 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

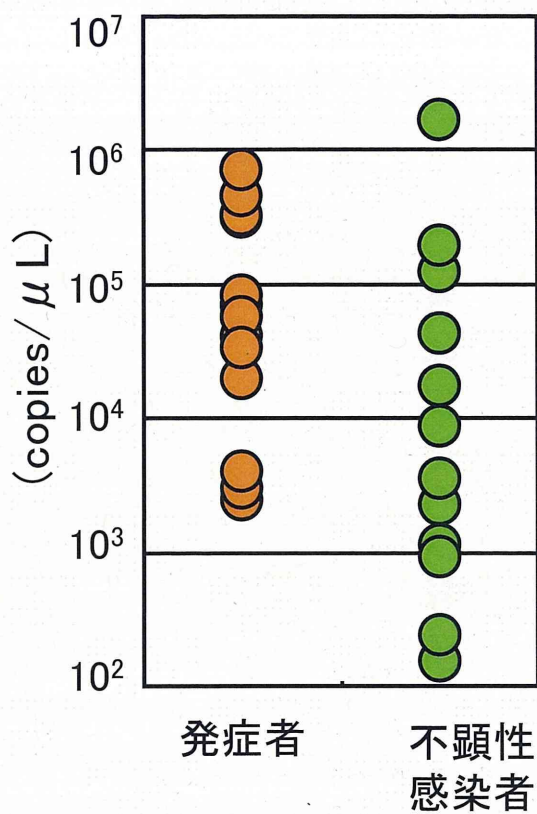
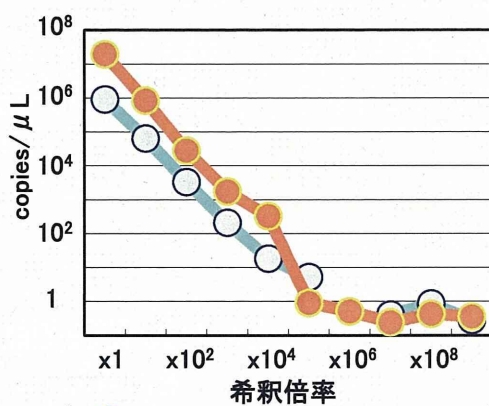
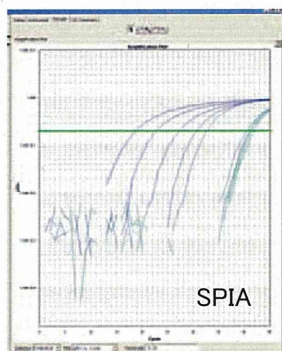
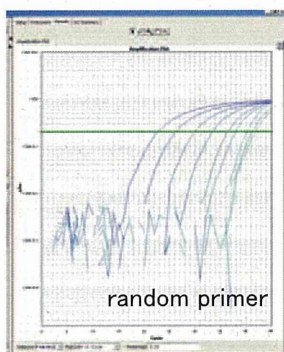
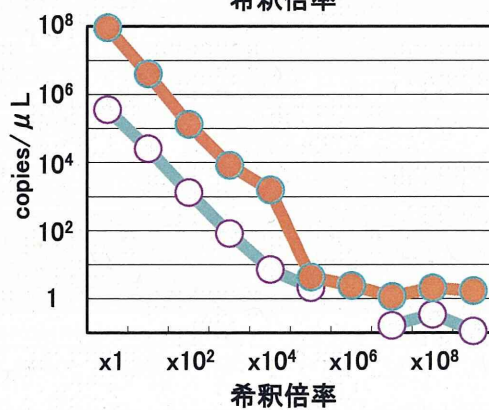


図1: 発症者および不顕性感染者における糞便中サポウイルス排出量の比較



— SPIA
— random primer



— SPIA
— random primer
RNA1 μLあたり

図2: MNV培養上清を用いた比較

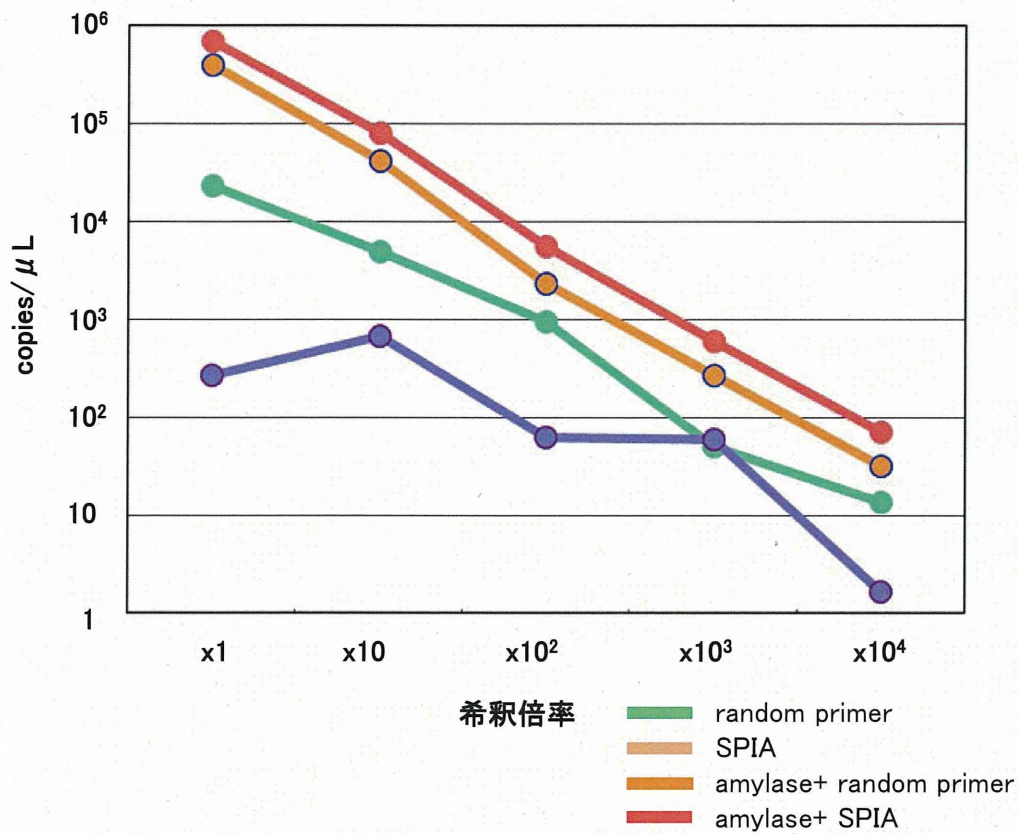


図3: カキ中腸腺乳剤に添加したMNV培養上清における希釈による補正後

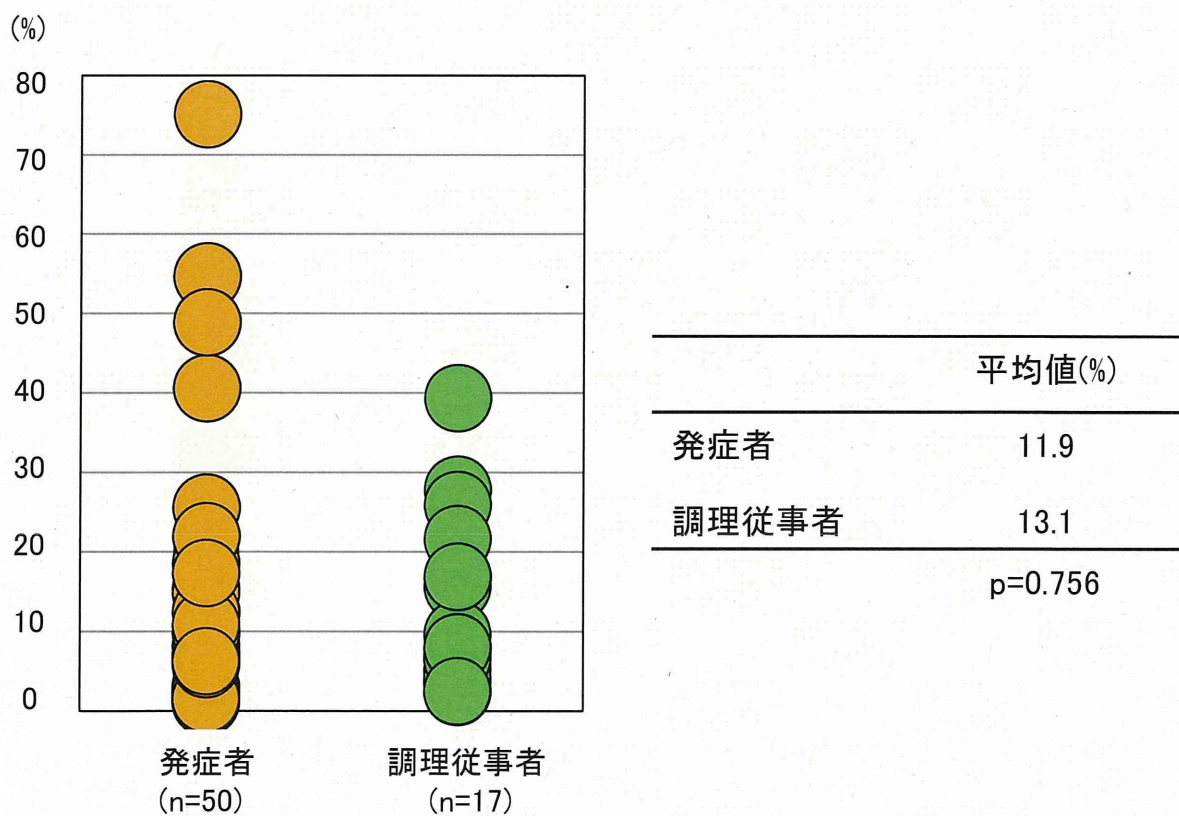


図4: 発症者と調理従事者における感染性粒子の比率

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)

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)

研究協力者	小林 慎一	愛知県衛生研究所
研究分担者	野田 衛	国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

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(NoV)の分子疫学的解析を行った。調査期間内に感染症発生動向調査事業定点医療機関で採取された胃腸炎患者の糞便 848 検体について NoV 検出検査を実施し、302 検体 (35.6 %、302/848) から NoV が検出された。NoV 陽性 302 検体の内、10 検体 (3.3%) が GI 陽性、292 検体 (96.7%) が GII 陽性であり、GII 型が大勢を占めた。主流となった遺伝子型は、3 シーズンを通じて GII.4 であったが、2014/15 シーズンには愛知県では非常に稀な GII.17 が散発的に検出された。2012/13 シーズンに Sydney_2012 型が新たな GII.4 変異型として出現し、世界的に大流行した。それ以後の 2 シーズンも Sydney_2012 型が優勢であった。これまで GII.4 型 NoV の遺伝子変異の出現がノロウイルス流行に関与してきたことから、今後も流行株の遺伝子型、特に GII.4 の遺伝子変異に関する監視が必要と考えられた。

A. 研究目的

ノロウイルス(NoV)は、冬季に流行する感染性胃腸炎の主要な原因ウイルスの1つである。2006/07 流行シーズンは、全国的に NoV に起因する感染性胃腸炎が大流行し、集団感染事例や食中毒事例が多発した。その流行の主体は GII.4 型に分類される遺伝子型であり、新たな変異ウイルス、2006 b 型の出現が大流行の要因となった。それ以後のシーズンも流行規模の大小はあるが、NoV の継続的流行が認められている。そこで、NoV の各遺伝子型の流

行状況を把握し、感染予防や食中毒防止の基礎資料とするために、2009年4月から2012年3月の散発性感染性胃腸炎患者からの検出された NoV の分子疫学的解析を行った。

B. 研究方法

1. 材料

2012年9月～2015年8月までの期間(2012/13～2014/15 シーズン)に愛知県の感染症発生動向調査事業の病原体定点で採取された散発性感染性胃腸炎患者の糞

便 848 検体を用いた。

2. NoV の検査法

Veal infusion broth で糞便を 10 % 乳剤とした後、10,000 G で遠心分離し、上清から High Pure Viral RNA Kit (Roche) を用いてウイルス RNA を抽出した。NoV の検出検査はウイルス性下痢症診断マニュアルに記載されたプライマーを用いた RT-PCR 法で実施した。NoV の遺伝子型は、構造タンパク遺伝子の PCR 増幅産物を Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega) で精製後、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ABI) を用いたダイレクトシーケンス法で塩基配列を決定し、Kroneman A らの報告 (Arch Virol 158: 2059-2068, 2013) に従い型別分類した。また、GII.4NoV 株については、GII.4 のクラスター分類を目的として既知の GII.4 変異株との相同性を解析した。系統樹解析は ClustalW を用いた近隣結合法で行った。

(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

1. NoV の検出状況

2012/13 シーズンは 291 検体の内 116 検体 (GI 陽性:1, GII 陽性:115, 39.9%)、2013/14 シーズンは 257 検体の内 84 検体 (GI 陽性:2, GII 陽性:82, 32.7%)、2014/15 シーズンは 300 検体の内 102 検体 (GI 陽性:7, GII 陽性:95, 34.0%) から NoV が検出され、いずれのシーズンに

においても GII 型が GI 型に比べて高頻度に検出された。

2. NoV の遺伝子解析

図 1 に NoV の月別・遺伝子型別の検出状況を示した。感染症発生動向調査の感染性胃腸炎患者報告数が急増する 11 月～12 月に GII 型の検出頻度が高かった。

図 2 に 2012/13 から 2014/15 シーズンの GII NoV の遺伝子型別検出状況を示した。GI で 5 種類、GII で 8 種類の多様な遺伝子型の NoV 流行が確認された。その中でも、調査期間を通じて GII.4 が主流であった。2014 年 12 月～2015 年 7 月にかけて、愛知県ではヒトから検出例のない GII.17 型が散発的に検出されたが、現時点では GII.4 を凌ぐような流行には至っていない。

GII.4 の遺伝子変異解析を目的として、調査期間内に検出された GII.4 株をクラスター分類した結果、Asia2003、Den Haag2006b 及び 2012_Sydney の 4 亜型に分類されたが、3 シーズンを通じて 2012_Sydney が大勢を占めた (図 3)。調査期間内には 2012_Sydney に代わる新たな変異型の出現は認められなかった。

D. 考察

2006/07 シーズンに GII.4 の 2006b 型に分類される新たな変異株が出現し、世界的に大流行した。それ以後も、流行規模の大小はあるが、冬季をピークとして感染性胃腸炎流行が続いている。2012/13 シーズンには GII.4 Sydney_2012 が 2006b 型に代わる新たな変異型として出現し、全世界的に大流行した。続く 2 シーズンは新たな変異型の出現はなく、GII.4

Sydney_2012 が大勢を占めていた。

2014 年 12 月～2015 年 7 月にかけて、愛知県ではヒトから検出例のない GII.17 型が散発的に検出された。現時点では GII.4 を凌ぐような流行には至っていないが、今後の動向に注意が必要である。

NoV は遺伝的に多様性に富むウイルスであるので、今後も流行の主流となるウイルスの遺伝子変異の監視が必要である。

E. 結論

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由来の NoV の分子疫学的解析の結果、2012/13 シーズンに GII.4 Sydney_2012 が GII.4 の新たな変異型として出現し、全世界的に大流行した。それ以降の 2 シーズンも GII.4 Sydney_2012 が主流であり、Sydney_2012 型に代わる新たな変異型の出現は認めなかった。また、2014/15 シーズンには、愛知県では非常に稀な GII.17 が散発的に検出された。今後も、NoV の遺伝子変異や遺伝子構造の変化が NoV 流行に関わると想定されるので、主流となる NoV に対する監視が重要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 小林慎一、山下照夫、皆川洋子：サポウイルス食中毒、臨床とウイルス、41、

52-60, (2013)

2) 中根邦彦、小林慎一：岡崎市におけるノロウイルス遺伝子型の 6 年間の特徴—2007 年 4 月～2013 年 3 月—、感染症学雑誌 88(6)：875-877 (2014)

2. 学会発表

1) 小林慎一、中村範子、安達啓一、伊藤雅、安井善宏、山下照夫、皆川洋子：平成 24 年度の愛知県におけるノロウイルスの検出状況 (12/13 シーズン)、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸市 11/11 (2013)

2) 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)

3) 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)

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