

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

ウイルスを原因とする食品媒介性疾患の制御に関する研究

平成 28 年度 総括研究報告書

研究代表者 野田 衛

平成 29 (2017) 年 3 月

平成 28 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)
「ウイルスを原因とする食品媒介性疾患の制御に関する研究」
総括研究報告

ウイルスを原因とする食品媒介性疾患の制御に関する研究

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

ノロウイルス等のウイルスによる食品媒介性疾患の発生及び被害の拡大を効果的に低減するための手法の確立を目標として以下の研究を実施した。

1. 食中毒検査体制の強化に関する研究

10 機関を対象にノロウイルス定量検査の外部精度管理を実施した結果、概ね良好な結果が得られた。パンソルビン・トラップ法の捕捉抗体として用いられているガンマグロブリンが、これまで流行したことの無い GII. 17 に対しても適用できることを確認した。メタゲノム解析を下水からのウイルス検出に適応した結果、ノロウイルスやサポウイルスを幅広く検出することができた。食中毒事例の調理従事者および患者から検出されたノロウイルスの塩基配列は、RT-PCR の検出プライマー内の配列が一致する同一事例内の検体は、VP1 全長などより長い配列を用いて比較してもほぼ一致した。迅速簡便なふき取りからのウイルス検出法を開発した。カキからのノロウイルス検出においてアミラーゼ・アセトン法は簡便で、従来法と同等の感度であった。下水、患者、カキ等からのウイルスの検出と遺伝子解析を実施し、食品媒介ウイルスの流行状況を把握した。2015/16 シーズンは、GII. 4(Sydney2012)、GII. 17、GII. 3 など、2016/17 シーズンは GII. 2 などが主要流行株であった。市販カキ等について検査したところ、カキ自体に加え、浮遊液からもノロウイルスが検出された。流入下水中のノロウイルス汚染量は感染性胃腸炎の患者数の増加より、早期に増加することが確認された。2016/17 シーズンに流行したノロウイルス GII. 2 は小児での流行が多い傾向にあった。これまで報告のないキメラウイルス GII. P16-GII. 4 Sydney_2012 が 2 事例確認された。CaCo-2 細胞や胆汁等を用いた NoV の分離培養法の検討を開始した。

2 調理従事者からの二次汚染防止に関する研究

水溶性高分子ポリマー化合物をコーティングした後、手洗いすることで、簡易な手洗いで効率的に汚染を除去することができた。冬季の公衆トイレはノロウイルスに汚染していることを実証した。低温加熱によるノロウイルスの遺伝子定量値はネコカリシヤやコクサッキーウイルス B5 型と概ね類似した動きを示したことから、ノロウイルスもそれらと概ね同様の条件で不活化される可能性が示された。各種の電解水やファインバブルについてネコカリシヤウイルスとマウスノロウイルスに対する不活化効果を検討

した結果、弱酸性電解水の不活化効果が高い傾向が認められた。各種の消毒剤に対する不活化効果はウイルスや株により異なることが示されたことから、この結果を踏まえ、ガイドラインに示すウイルスや株の選定を行う予定である。

研究分担者		佐藤 直人	岩手県環境保健研究センター
斎藤 博之	秋田県健康環境センター		
	—	高橋 雅輝	同上
滝澤 剛則	富山県衛生研究所	梶田 弘子	同上
鈴木 達也	一般財団法人食品薬品安全センター	植木 洋	宮城県保健環境センター
高木 弘隆	国立感染症研究所	菅原 直子	同上
上間 匡	国立医薬品食品衛生研究所	田村 務	新潟県保健環境科学研究所
		新井 礼子	同上
研究協力者		宗村 佳子	東京都健康安全研究センター
中阪 聡亮	一般財団法人食品薬品安全センター	森 功次	同上
秋野 和華子	秋田県健康環境センター	永野 美由紀	同上
	—	木本 佳那	同上
佐藤 寛子	同上	小田 真悠子	同上
清水 優子	日本大学・医学部・微生物学教室	奥津 雄太	同上
		秋場 哲哉	同上
牛島 廣治	同上	清水 智美	川崎市健康安全研究所
名古屋 真弓	富山県衛生研究所	清水 英明	同上
稲崎 倫子	同上	入谷 展弘	大阪市立環境科学研究所
板持 雅恵	同上		
嶋 一世	同上	改田 厚	同上
長谷川 澄代	同上	阿部 仁一郎	同上
吉澄 志磨	北海道立衛生研究所	上林 大起	同上
後藤 明子	同上	山元 誠司	同上
大久保 和洋	同上	久保 英幸	同上
石田 勢津子	同上	三好 龍也	堺市衛生研究所
筒井 理華	青森県環境保健センター	内野 清子	同上
	—	中谷 誠宏	同上
坂 恭平	同上	岡山 文香	同上
菩提寺 誉子	同上	吉田 永祥	同上

小林 和夫	同上
谷澤 由枝	広島県立総合技術研究所保健環境センター
重本 直樹	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
八島 加八	同上
松室 信宏	同上
小林 孝行	福岡県保健環境研究所
吉富 秀亮	同上
芦塚 由紀	同上
中村 麻子	同上
梶原 淳睦	同上
小菅 大嗣	麻布大学
永田 宏文	国立医薬品食品衛生研究所
三元 昌美	同上

(順不同)

A. 研究目的

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食中毒も増加傾向にある。近年のウイルスを原因とする食中毒は食品取扱者からの食品の二次汚染を原因とする場合が多く、その汚染防止対策の確立が急務である。ウイルス性食中毒発生時に、迅速な原因究明や蔓延防止のための措置の実施を可能とするためには、発生例の原因食品や感染経路を特定することが重要である。しかし、遺伝子の変異を検出できないなどの事例も認められており、より簡便かつ網羅的な検査法の確立が求められている。また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。食品ウイルス検査は外部精度管理体制が確立されていないため信頼性が確保されておらず、検査の信頼性確保も急務の課題である。一方、飲食店や大規模調理施設等における、食品従事者からの二次感染を効果的に予防するためには、手洗い、環境・トイレの清掃・消毒等が確実に実施されていることを検証するための簡便な方法、現場に応じたウイルスの除去方法の確立が求められている。さらに現在ノロウイルスに有効とされる各種消毒剤が市販されているが、不活化試験の検査法が定まっていないこと等から有効性を客観的に判断することができず、試験法のガイドラインが求められている。

本研究では、近年、件数・患者数ともに増加傾向にある、ノロウイルス、サポウイルス、E型肝炎ウイルス等のウイルスによる食品媒介性疾患の発生及び被害の拡大を効果的に低減するための手法の確立を目標とする。

B. 研究方法

1. 食中毒検査体制の強化に関する研究

(1) 食品のウイルス検査の精度管理

国内で食品のノロウイルス検査を実施している10機関を対象として、検体7種〔高濃度検体：3種、低濃度検体：3種（3種はいずれも同一濃度）および陰性検体：1種〕、および標準DNA溶液を調査検体として配布し、定量検査を各検査機関にて実施した後、回収した結果の解析を行った。検査方法はあらかじめ指定した共通の方法とし、検量線作成用陽性コン

トロール溶液も共通とした。

(2) 食中毒調査等に係る検査法の開発・改良・評価

① パンソルビン・トラップ法を用いる際の RNA 検出系の最適化パンソルビン・トラップ法の捕捉抗体供給源としてのガンマグロブリンの再評価

一般食品からのウイルス検出法であるパンソルビン・トラップ法について、新しい変異株である GII.17 (GII.P17:GII.17) に対して本法が対応可能か検討した。

② メタゲノム解析による下水からのノロウイルス・サポウイルスの検出

2011年から2013年に富山県で採取した下水流入水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い、ノロウイルスとサポウイルスの検出を試みた。

③ 現行の遺伝子解析手法の評価

食中毒か感染症かの判断に有用とされている患者、調理従事者、食品等から検出されたノロウイルスの塩基配列の比較について、実際の食中毒事例等において検証した。

④ ふき取り検体からのウイルス検出法の改良

ふき取り検体からのノロウイルス検出法について、検査時間の短縮および検出感度の向上を目的に改良を行った。

⑤ カキからのウイルス検出法の改良

カキからのウイルス検出においてアセトン処理の有用性を調べた。

⑥ 市販ノロウイルス検出キットの評価

市販ノロウイルス検出キットについて遺伝子型ごとの検出率について比較した。

(3) 食品媒介ウイルスの食中毒事例、胃腸胃炎事例、下水および食品からの検出と遺伝子解析

富山県、宮城県、堺市、福岡県において定期的に下水からの食品媒介性ウイルスの検出を行い、患者からの検出ウイルスや感染性胃腸炎報告数と比較した。

北海道、青森県、岩手県、秋田県、東京都、川崎市において食中毒等の集団胃腸炎からのウイルスの検出と遺伝子解析を行い、流行ウイルスの性状把握を行った。

秋田県、広島市において、カキ等の二枚貝からノロウイルス等の検出と遺伝子型別を行い、ヒトから検出ウイルスと比較した。

(4) ノロウイルスの培養法の検討

ノロウイルスの培養に関する情報を整理し、CaCo-2細胞や胆汁等を用いた培養法に向けた基礎的実験を行った。

2. 調理従事者からの二次汚染防止に関する研究

(1) 低温加熱によるノロウイルスの不活化

ノロウイルス GI, GII, ネコカリシウイルスおよびコクサッキーウイルスB群5型を10% Beef extract加PBS(-)溶液で希釈したものを60℃以下の低温で長時間加熱を行い、感染価および遺伝子定量値の測定によって評価した。

(2) ノロウイルスの不活化

不活化試験でノロウイルスの代替として用いられているネコカリシウイルスとマウスノロウイルスの系を用いて、消毒剤のウイルス不活化効果（電解水・ファ

インバブルの相乗効果)について検討した。

また、市販のペットシートに熱湯を含ませた場合どれくらい温度を保持することが可能なかを検討した。

(3) ウイルスの不活化法のガイドライン作成のための基礎研究

消毒剤のウイルスに対する不活化効果判定試験法のガイドライン作成に必要な基礎データを得るために、評価試験に使用するウイルスの候補として想定している数種類のウイルス(ネコカリシウイルス2株, マウスノロウイルス1株, エンテロウイルス71型1株, ポリオウイルスワクチン株1株)を用いて, エタノール製剤や次亜塩素酸ナトリウム, 酸化剤などの不活性化効果を比較した。

(4) 効率的な手洗いの方法の検討

水溶性高分子ポリマーで手指をコーティングすることで, その後の汚染を簡易に除去できないか検討した。

(5) トイレの汚染リスク評価

トイレにおける感染リスクの基礎資料とするために, 2016年10月~12月の間に, 9つの公共施設内トイレについて, ふき取りによるノロウイルスモニタリング調査を行った。

(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) 食品のウイルス検査の精度管理

検量線の濃度範囲を 10^1 コピーまで拡張しても, 相関係数は 10^3 コピー以上の濃度範囲の場合と同等であった。また, 標準 DNA 溶液において 1 機関で高めの値を報告したが, その他の検査試料では全ての検査機関で正しく検査が実施されていた。これらの結果のばらつきは非常に小さいものであった。今後はより食品検体に近い調査試料を開発し, 抽出工程のみならず, 濃縮工程を含んだ外部精度管理調査を実施する必要がある。

(鈴木研究分担報告)

(2) 食中毒調査に係る検査法の開発・改良・評価

① パンソルビン・トラップ法を用いる際の RNA 検出系の最適化パンソルビン・トラップ法の捕捉抗体供給源としてのガンマグロブリンの再評価

添加回収試験において, GII. 17 の回収率は GII. 4 のそれには及ばないものの, 汚染濃度が低くなるにつれて高くなる傾向が認められた。低濃度領域の汚染を検出するために用いられる nested real-time PCR を用いた検討では, ポテトサラダと焼きそばにおいて, 35 コピー/g まで検出可能であり, すでに発表済の GII. 4 におけるものと同様であった。

(斎藤研究分担報告)

② メタゲノム解析による下水からのノロウイルス・サポウイルスの検出

富山県で2011年から2013年に採取した下水流入水について次世代シーケンサーを用いてノロウイルスとサポウイルスの検出を試みた結果、ノロウイルス GI, GII, GIV, SaV GI, GII, GIV, GV の配列が得られた。ダイレクトシーケンス法では検出されなかった遺伝子群や遺伝子型についても検出された一方で、ダイレクトシーケンス法よりも検出感度が低い場合もあった。

(稲崎研究分担報告)

③ 現行の遺伝子解析手法の評価

北海道において、現在、通常の検査で患者や食品等からのノロウイルス遺伝子の検出に用いているPCRの増幅産物(RdRp領域:約290nt, RdRp-VP1領域:約340nt)の塩基配列が一致する検体は、より長い配列を用いて比較してもほぼ一致することが示された。

(吉澄研究協力報告)

青森県で2013/14~2015/16シーズンに発生したノロウイルス集団胃腸炎事例は49事例で、調理従事者が関与した食中毒事例は6事例であった。5事例の発症者便と調理従事者便等の塩基配列の相同性は100%で、1事例では1塩基異なる検体が見られた。

(筒井研究協力報告)

大阪市において、調理従事者からノロウイルスが検出された食中毒を対象に、調理従事者と患者の両者由来ノロウイルスの遺伝子解析を実施したところ、すべての事例において両者由来ノロウイルス

の遺伝子型、塩基配列が一致した。特に食中毒か感染症かの判断が困難な事例において、調理従事者由来ノロウイルスの遺伝子解析は有用であった。

(入谷研究協力報告)

④ ふき取り検体からのウイルス検出法の改良

ふき取りおよび再浮遊液に0.3%Zwittergent 加PBS(-)を用い、核酸抽出に供する試料の量を増やすことで、濃縮行程無しでも効率的にノロウイルスを検出することができた。

(谷澤研究協力報告)

⑤ カキからのウイルス検出法の改良

同一ロットのカキについて旧アミラーゼあるいは新アミラーゼで処理したPEG沈殿法と新アミラーゼとアセトンで処理した方法の実測値を比較したところ、法全体的にアミラーゼ・アセトン法が同等あるいは若干高い結果であった。

(山本研究協力報告)

⑥ 市販ノロウイルス検出キットの評価

比較した市販ノロウイルス検出キットにおいて、GII.4, GII.17は全てのキットで検出可能であったが、GII.2およびGII.6に対しては感度が不十分なキットがあることが示唆された。

(小林研究協力報告書)

(3) 食品媒介ウイルスの食中毒事例、胃腸胃炎事例、下水および食品からの検出と遺伝子解析

富山県において、2016年の感染性胃腸炎患者、下水流入水からウイルス検出を試みた結果、患者からはノロウイルス GII.4, GII.17, GII.2, サポウイルス GI.1 など、下水からはノロウイルス GII.4,

GII. 17, GI. 6などが検出された。1月～8月には集団発生事例, 小児散発例, 下水からノロウイルスGII. 4が, 集団発生事例と下水流からノロウイルスGII. 17が共通して検出された。11月～12月はノロウイルスGII. 2が主流であった。

(稲崎研究分担報告)

北海道において平成28年度に発生したノロウイルスによる集団胃腸炎は, 4～6月はGII. Pe_GII. 4 Sydney 2012, 11月以降はGII. P16_GII. 2が優勢であった。GII. P16_GII. 2の検出は感染症事例では主に低年齢層の事例(保育所・幼稚園, 小学校)で認められ, 12月以降は食中毒事例からの検出もGII. P16_GII. 2のみであった。

(吉澄研究協力報告)

青森県で2013/14～2015/16シーズンに発生したノロウイルス集団胃腸炎事例は49事例で, 調理従事者が関与した食中毒事例は6事例であった。5事例(事例番号23を除く)の発症者便と調理従事者便等の塩基配列の相同性は100%で, 1事例では1塩基異なる検体が見られた。

(筒井研究協力報告)

岩手県で2015/16シーズンに発生した集団発生事例38事例のうち36事例はノロウイルスによるもので, GII. 4(Sydney 2012)が12事例, GII. 17が11事例, GII. 3が9事例などであった。施設別では, 保育所が17事例, 高齢者施設5事例, 飲食店4事例などで, 保育所ではGII. 3, 食中毒事例ではGII. 17が多く検出された。

(佐藤研究協力報告)

秋田県で2016年1月購入生カキからGII. 3, GII. 17, GI. 2, GI. 4が, パック充

填の浮遊液からGII. 17, 2月購入生カキからGII. 4 Sydney 2012, GII. 17, GI. 2, GI. 4が, 3月購入アサリからGII. 6とGI. 7のノロウイルスが検出された。サポウイルスは陰性であった。10月, 11月, 12月に購入した生カキおよびアサリのうち12月のカキからGII. 2とGII. 3が, 11月と12月のアサリからGII. 2が, 12月のアサリからGI. 7のノロウイルスが検出された。また, 2016年の秋田県の食中毒3事例はすべてノロウイルスによるもので, 検出遺伝子型はGII. 4 Sydney 2012とGII. 17であった。集団感染事例ではGII. 2が最も多く, 感染症発生動向調査ではGII. 4 Sydney 2012が最も多く, 次いでGII. 2であった。

(秋野研究協力報告)

宮城県において, 流入下水について, ノロウイルスおよびサポウイルスの検出を試みた結果, 各ウイルス遺伝子は通年検出された。下水から検出された両ウイルスの遺伝子型は感染性胃腸炎患者から検出された遺伝子型と同じであった。また, 下水中のノロウイルス濃度は感染性胃腸炎患者報告数の増加よりも, 早期に上昇することが確認された。

(植木研究協力報告)

東京都において, 2013/14～15/16シーズンのノロウイルスによる集団発生例において, 2013/14シーズンではGII. 4が55.1%の事例から, 2014/15と2015/16シーズンではGII. 17がそれぞれ33.1%, 42.6%から検出され, 多くを占めた。85例のGII. 17について全長解析を行なったところ, 全てGII. P17-GII. 17であり, 8582例は系統樹上,

Hu/GII. P17-GII. 17/Kawasaki308/2015/J P (Kawasaki308 株) と同一のクラスターに属した。

(宗村研究協力報告)

川崎市において、2014年9月から2017年1月に集団事例から検出されたノロウイルスの遺伝子型は、2014/15 シーズンではGII. 4 (23 事例), GII. 17 (16 事例), GI. 2 (8 事例), 2015/16 シーズンではGII. 17(14 事例), GII. 4(11 事例), 2016/17 シーズンでは (集計時現在) GII. 2 (13 事例) が主流であった。

(清水研究協力報告)

大阪市の集団胃腸炎 2 事例から、これまで報告のないキメラウイルス GII. P16-GII. 4 Sydney_2012 が確認されたが、今のところ、その発生は 2 事例のみである。2016 年 11 月および 12 月に大阪市内の保育園や小学校においてノロウイルス GII. 2 事例が多発した。12 月市販の生食用カキにノロウイルス汚染 (33. 3%) が認められ、その遺伝子型は GII. 2 であった。

(入谷研究協力報告)

堺市において 2014 年～2016 年の下水中のノロウイルス汚染量は感染性胃腸炎患者の報告数のピークと同時期にピークとなり、また報告数が多いほど定量値も大きくなった。臨床検体と下水検体から検出される遺伝子型に相関がみられた。A 型肝炎患者の報告はなかったが、A 型肝炎ウイルスが 3 か所から検出された。遺伝子解析の結果から少なくとも 2 系統の異なる A 型肝炎ウイルスに分けられた。

(三好研究協力報告)

広島市で、2016/17 シーズンに採取されたカキからノロウイルス GII. 17 のみが 3 ロットから検出され、Hu/GII/JP/2015/GII. P17-GII. 17/Kawasaki308 に近縁な株であった。ヒトからは、全国的に流行している GII. 2 が最も多く 5 株検出され、RdRp 領域の解析ができた 2 株はいずれも GII. P16-GII. 2 であった。

(山本研究協力報告書)

福岡県において、2015/16 シーズンの下水流入水中のノロウイルス定量値は $10^6/L$ で推移し、例年と比較して少ない流行であった感染性胃腸炎報告数と相関が認められた。

(小林研究協力報告書)

(4) ノロウイルスの培養法の検討

CaCo-2細胞を用いて、安定的に上皮構造を形成させることが可能となった。

2. 調理従事者からの二次汚染防止に関する研究

(1) 低温加熱によるノロウイルスの不活化

低温加熱試験において、感染価はネコカリシウイルスでは45℃一夜、50℃ 6時間、55℃ 2時間、60℃ 1時間、コクサッキーウイルスB5型では55℃ 一夜、60℃ 1時間の加熱で検出限界以下となった。ノロウイルスの遺伝子定量値はそれらの遺伝子定量値と類似した動きを示した。

(上間研究分担報告)

(2) ノロウイルスの不活化に関する研究

電解水およびファインバブルの不活化に関して、ネコカリシウイルスでは電解水のpHによる不活化効果が認められたが、

ファインバブルの有無による有意な差は認められなかった。マウスノロウイルスでは、ファインバブルと弱酸性電解水の併用で最も高い不活化効果が認められたが、さらなる検討が必要である。

市販ペットシートに熱湯を加えて加熱する方法は、床や卓上などの表面が平滑な環境では汚染したノロウイルスの不活化が期待できる温度保持ができた。一方、カーペット（絨毯）では深部での温度が十分に上昇せず、ノロウイルスの不活化が期待できる温度保持はできなかった。また、ペットシートの中心部と比較して、端では高温の持続が困難であった。

（上間研究分担報告）

(3) ウイルスの不活化法のガイドライン作成のための基礎研究

エタノール製剤、次亜塩素酸ナトリウム、酸化剤などによる不活効果は、各ウイルスや使用した株によって顕著な違いが認められた。

（高木研究分担報告）

(4) 効率的な手洗いの方法の検討

3%カルボキシメチルセルロースの45%エタノール液（CMC液）や7%ポリエチレングリコール85%エタノール液（PEG液）により指をコーティングし、簡易な水洗いを行ったところ、墨汁の汚れを容易に落とすことができた。また、CMC液のコーティングにより、水流のみでノロウイルスの汚染を79%低減できた。また、PEG液のコーティングに加え指をこすすることで、ノロウイルスの汚染を87%洗い流すことができた。

（田村研究協力報告）

(5) トイレの汚染リスク評価

トイレのふき取り調査において、便座裏38検体中7検体、ペーパーホルダー36検体中1検体からノロウイルスが検出された。検出遺伝子型は、GII.2が5検体、GII.6、GII.7およびGII.17が各1検体から検出された。

（谷澤研究協力報告）

D. 考察

1. 食中毒検査体制の強化に関する研究

(1) 食品のウイルス検査の精度管理

参加機関の評価を行うためXbar-R管理図を参考とした解析またはzスコア管理図を採用したが、より多くの検査機関が参加した場合に検査結果のばらつきが大きくなる可能性も否定できないことから、評価に用いる管理限界線の値について、経験則に基づいた一定の標準偏差を用いることも一案であると考えられた。

（鈴木研究分担報告）

(2) 食中毒調査に係る検査法の開発・改良・評価

① パンソルビン・トラップ法を用いる際のRNA検出系の最適化パンソルビン・トラップ法の捕捉抗体供給源としてのガンマグロブリンの再評価

ガンマグロブリンを捕捉抗体として用いるパンソルビン・トラップ法は、GII.17に対しても問題なく適用できることが示された。

（斎藤研究分担報告）

② メタゲノム解析による下水からのノロウイルス・サポウイルスの検出

メタゲノム解析では、常法では検出されなかった遺伝子群及び遺伝子型の配列も検出され、下水検体に含まれる複数種

類のノロウイルスやサポウイルスを幅広く検出するには有用であると考えられた。一方、ノロウイルス GI で、常法よりも検出率が低い場合があり、その原因として、GI のウイルス量が少ない可能性が考えられた。特異的プライマーを用いたダイレクトシーケンス法や、NGS を用いたディープシーケンス法の併用も考慮する必要があると考えられた。

③ 現行の遺伝子解析手法の評価

北海道における食中毒事例内の検体の比較においては、RT-PCR の検出用プライマー内の短い配列情報 (RdRp および VP1 領域の一部) を用いた結果が、その領域全体の一致・不一致の状況から大きくは逸脱しないと考えられた。

(吉澄研究協力報告)

青森県で、同一事例内で異なる塩基配列が検出された事例が 1 事例認められたが、原因としてシーケンサーの塩基配列の読み違い、遺伝学的な変異などが考えられた。引き続きデータを蓄積する必要がある。

(筒井研究協力報告)

④ ふき取り検体からのウイルス検出法の改良

一般的に、ふき取り検体からのノロウイルス検出には超遠心や PEG 沈殿などのウイルスの濃縮操作を行うが、ふき取りおよび再浮遊液に 0.3% Zwittergent 加 PBS(-) を用い、核酸抽出量を増やすことで、濃縮行程無しでも効率的にノロウイルスが検出できた。迅速、簡便なふき取り検査法として有用と思われる。

(谷澤研究協力報告書)

⑤ カキからのウイルス検出法の改良

カキからのノロウイルス検出法として検討したアミラーゼ・アセトン法の検出感度は、従来法であるアミラーゼ・PEG 沈法と同等あるいは若干高く、検査時間の短縮が図れる等のメリットがある。

⑥ 市販ノロウイルス検出キットの評価

近年流行していない遺伝子型は検出キットにより検出できないことが示唆された。流行するノロウイルスの遺伝子型が変化したシーズンは特に反応性の評価を行う必要があると考えられた。

(小林研究協力報告書)

(3) 食品媒介ウイルスの食中毒事例、胃腸胃炎事例、下水および食品からの検出と遺伝子解析

ノロウイルスによる食中毒の発生は、ノロウイルスの流行状況や流行する遺伝子型の変化等により影響を受ける。そのため、流行ウイルスの検出動向について継続的に監視することが、食中毒予防に寄与する。食中毒事例等の集団発生や感染症発生動向調査などから検出されたノロウイルスの遺伝子型等を調べた。2013/14 シーズンは GII. 4 (東京都), 2014/15 シーズンは GII. 17 (東京都, 川崎市), GII. 4 (川崎市), GI. 2 (川崎市), 2015/16 シーズンは GII. 4 (Sydney 2012) (富山県, 北海道, 岩手県, 秋田), GII. 17 (富山県, 岩手県, 秋田, 東京都, 川崎市), GII. 3 (岩手県), GII. 4 (川崎市), 2016/17 シーズンは GII. 2 (富山県, 北海道, 秋田県, 川崎市, 大阪市) などが、主要流行遺伝子型であった。GII. 2 による感染症事例は主に低年齢層の事例であったが、食中毒事例からも多く検出された。

ノロウイルス等の食品媒介性ウイルスは糞便中に排出される。そのため、下水を継続的にモニタリングすることにより、顕性感染や不顕性感染を問わず、ヒトでの流行状況を迅速にモニタリングすることができる。また、下水中のウイルス汚染量をモニタリングすることにより、患者の発生動向よりも先に流行の増加を捉えることができる可能性もある。また、カキ等の二枚貝がノロウイルス等の汚染を受ける主な原因は下水であることから、下水中のウイルスのモニタリングはカキ等の二枚貝の汚染リスクを早期に探知し、汚染防止に寄与できる可能性がある。これらの背景から、我々は長期に渡り、下水のウイルス調査を継続している。今年、従来の富山県、堺市、福岡県に加えて、宮城県においても、下水の調査を実施した。これまでの調査と同様に下水中のノロウイルス汚染量は感染性胃腸炎患者の報告数のピークと同時期に、とピークとなり、また報告数が多いほど定量値も大きくなり、臨床検体と下水検体検出される遺伝子型に相関がみられた。さらに、宮城県において流入下水中のノロウイルス汚染量は感染性胃腸炎の患者数の増加より、早期に増加することが確認された。このことから、流入下水のノロウイルス汚染量を継続的に監視することにより、感染性胃腸炎の流行をの早期に探知することができるかの可能性が示された。一方、他の地域ではそのようなことは明確には確認されていない。引き続き調査を継続し、下水中のウイルス量と感染性胃腸炎の発生動向の関連性についてデータを蓄積する予定である。

堺市において下水からA型肝炎ウイルスが検出された、A型肝炎患者の報告はなかったが、遺伝子解析の結果から少なくとも2系統のA型肝炎ウイルスの感染があったと考えられた。また、このことは下水の汚染を受けるカキ等の二枚貝にA型肝炎ウイルスが汚染するリスクがあることを示唆している。

カキが関連する食中毒事例から検出されるノロウイルスの遺伝子型はGIが比較的多いなど、必ずしも、ヒトで流行している遺伝子型や二枚貝以外の食中毒事例や集団感染事例から検出される遺伝子型と一致するわけではない。そのため、二枚貝から検出されるノロウイルス遺伝子型とヒトから検出される遺伝子型に関するデータを蓄積することはカキ関連食中毒の予防や発生要因の解明に重要である。秋田県の調査では、カキとヒトから検出されたノロウイルスの遺伝子型に関連が認められた一方、広島市の調査ではヒトからは多様な遺伝子型が検出されたが、カキからはGII.17が多く検出されるなど両者に違いが認められた。一方、今回市販パック詰めカキの浮遊液からノロウイルスが検出された。このことは、調理時における汚染拡大の原因となり得る危険性を示唆しており、注意喚起を促すひとつのデータとして重要な結果であると考えられる。

(4) ノロウイルスの培養法の検討

ノロウイルスの培養に関する各種の論文を参考に、ノロウイルスの培養に関与する腸内細菌 (*Enterobacter cloacae*)、胆汁等を準備した。現在、腸内細菌の添加、胆汁酸等の添加条件の検討を行い、

CaCo-2細胞での腸内環境の再現を試みているところである。

2. 調理従事者からの二次汚染防止に関する研究

(1) 低温加熱によるノロウイルスの不活化

低温加熱によりノロウイルスの遺伝子定量値はネコカリシやコクサッキーウイルスB5型と類似した動きを示したことから、ノロウイルスもそれらと概ね同様の条件で不活化(例：60℃，1～2時間)されているものと推定され、低温加熱がウイルスの簡便な不活化法として有用と考えられた。

(上間研究分担報告書)

(2) ノロウイルスの不活化

各種の電解水とファインバブル水についてネコカリシウイルスとマウスノロウイルスを用いて不活化効果を比較したところ、ネコカリシウイルスでは、微酸性電解水、弱酸性電解水、アルカリ電解水、およびファインバブル存在の弱酸性電解水で概ね同等の不活化効果が認められたが、マウスノロウイルスでは、弱酸性電解水とファインバブル存在の弱酸性電解水である程度の不活化効果が認められた。マウスノロウイルスはネコカリシウイルスと比較して、pH安定性が高いと報告されており、反応時間が3分間と短いことから、この結果は妥当であると考えられた。

市販のペットシートに温水を含ませた場合、卓上、床であればウイルスの不活化は期待できるが、カーペットでは十分な効果は期待できない結果であった。ペ

ットシート中心部と比較して、端では高温の持続は難しく、汚染範囲が広い場合にはペットシートの敷き方に注意が必要である。

(上間研究分担報告)

(3) ウイルスの不活化法のガイドライン作成のための基礎研究

各種の消毒剤に対する不活化効果はウイルスにより、また株により異なることから、これらの結果を踏まえ、ガイドラインに示すウイルスや株の選定を行う予定である。

(高木研究分担報告)

(4) 効率的な手洗いの方法の検討

トイレの前に手指をコーティング剤で保護することで、トイレ後の手洗いにおいて、トイレ中のウイルス汚染を効率的に洗い流すことができる可能性が示唆された。

(田村研究協力報告)

(5) トイレの汚染リスク評価

感染性胃腸炎流行期の公共施設トイレは、高率にノロウイルスに汚染されており、感染リスクがあることが実証された。

(谷澤研究協力報告)

E. 結論

1. 食中毒検査体制の強化に関する研究

- 10 機関を対象にノロウイルス定量検査の外部精度管理を実施した結果、概ね良好な結果が得られた。
- パンソルビン・トラップ法の捕捉抗体として用いられているガンマグロブリンが、これまで流行したことの無いGII. 17に対しても適用できることを確認した。

- メタゲノム解析を下水からのウイルス検出に適応した結果、ノロウイルスやサポウイルスを幅広く検出することができた。
 - 食中毒事例の調理従事者および患者から検出されたノロウイルスの塩基配列は、RT-PCRの検出プライマー内の配列が一致する同一事例内の検体は、VP1全長などより長い配列を用いて比較してもほぼ一致した。
 - 同一事例内で異なる塩基配列が検出された事例が1事例認められたが、原因としてシーケンサーの塩基配列の読み違いの可能性が示唆された。
 - 迅速・簡便なふき取りの検査法を開発した。
 - カキからのノロウイルス検出においてアミラーゼ・アセトン法は、感度は従来法と同等であり、検査時間の短縮等のメリットがある。
 - 市販キットでGII.4とGII.17は全てのキットで検出可能であつが、GII.2およびGII.6に対しては検出感度に問題があることが示唆された。
 - 下水、患者、カキ等からのウイルスの検出と遺伝子解析を実施し、食品媒介ウイルスの流行状況を把握した。
 - 下水中のノロウイルス汚染量は感染性胃腸炎患者の発生動向と概ね一致し、報告数と下水中のノロウイルス定量値に相関性が見られた。臨床検体と下水検体から検出される遺伝子型にも関がみられた。
 - 流入下水中のノロウイルス汚染量は感染性胃腸炎の患者数の増加より、早期に増加することが確認された。
 - 下水3か所からA型肝炎ウイルス遺伝子が3検出され、検出ウイルスは遺伝子解析から少なくとも2系統に分けられた。
 - 市販カキ等について検査したところ、カキに加え、浮遊液からもノロウイルスが検出された。
 - 2016/17シーズンに流行したノロウイルスGII.2は小児での流行が多い傾向にあった。
 - 大阪市でこれまで報告のないキメラウイルスGII.P16-GII.4 Sydney_2012が確認された。
 - CaCo-2細胞を用いて、安定的に上皮構造を形成させることができた。
- ## 2. 調理従事者からの二次汚染防止に関する研究
- 水溶性高分子ポリマー化合物をコーティングした後、手洗いすることで、簡易な手洗いで効率的に汚染を除去することができた。
 - 感染性胃腸炎流行期の公共施設トイレは、高率にノロウイルスに汚染されており、感染リスクがあることが実証された。
 - 低温加熱によるノロウイルスの遺伝子定量値はネコカリシヤコクサッキーウイルスB5型と概ね類似した動きを示したことから、ノロウイルスもそれらと概ね同様の条件で不活化される可能性が示された。
 - 各種の電解水やファインバブルについてネコカリシウイルスとマウスノロウイルスに対する不活化効果を検討した結果、弱酸性電解水の不活化効果が高い傾向が認められた。

- ペットシートに温水を含ませる加熱方法は、床や卓上では、ウイルスの不活化が期待できる温度保持ができたが、カーペットでは困難であった。また、ペットシートの、中心部と端部について比較すると、中心部の温度保持が高い傾向にあった。
- 各種の消毒剤に対する不活化効果はウイルスにより、また株により異なることから、これらの結果を踏まえ、ガイドラインに示すウイルスや株の選定を行う予定である。

F. 健康危害情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) 野田 衛 (2016) 食品中の病原ウイルスの検出法, 食品衛生学雑誌, 57, J152-J155
- (2) 野田 衛 (2016) 食品取扱者を介して二次汚染! ノロウイルス対策, 718, 8-19 食中毒, 食と健康, 706, 8-18
- (3) 野田 衛 (2016) 二枚貝を介するノロウイルス食中毒の現状と対策, 食品衛生学雑誌, 58, 12-25
- (4) Hiroko Sato, Chihiro Shibata, Wakako Akino, Hiroyuki Saito, Shihoko Saito, Naota Monma, Akira Toukairin, Mamoru Takahashi, Hiromi Fujita, Teruki Kadosaka, Nobuhiro Takada, Hiroki Kawabata and Shuji Ando: Survey of *Leptotrombidium akamushi* in Omono river basin in Akita Prefecture, Japan in 2011~2014. *Med. Entomol. Zool.*, 67 (3), 167-175 (2016)
- (5) Hiroyuki Saito, Miho Toho, Tomoyuki Tanaka and Mamoru Noda: "PANtrap": A Novel Detection Method for General Food Samples. In Paul K. S. Chan, Hoi ShanKwan and Martin C. W. Chan (Eds.) *THE NOROVIRUS*. New York: Academic Press, pp145-153 (2016)
- (6) Hiroyuki Saito, Miho Toho, Tomoyuki Tanaka and Mamoru Noda: Development of a practical method to detect noroviruses contamination in composite meals. *World Biomedical Frontiers*, <http://biomedfrontiers.org/inf-2016-3-5/> (2016)
- (7) Naoki Shigemoto, Yuri Hisatsune, Yasushi Toukubo, Yukie Tanizawa, Yukie Shimazu, Shinichi Takao, Tomoyuki Tanaka, Mamoru Noda, and Shinji Fukuda (2016) Detection of gastroenteritis viruses among pediatric patients in Hiroshima Prefecture, Japan, between 2006 and 2013 using multiplex reverse transcription PCR-based assays involving fluorescent dye-labeled primers., *J Med Virol*, in press
- (8) 吉富秀亮, 芦塚由紀, 野田衛: 2015年2月の市販カキから検出されたノロウイルス GII.17 の分子遺伝学的解析. 福岡県保健環境研究所年報第43号, 114-117, 2016

- (9) 山元誠司, 上林大起, 改田 厚, 久保英幸, 入谷展弘, 小笠原 準, 伯井紀隆, 森 宏美, 藤森良子, 廣川秀徹, 松本健二, 吉村高尚: G2 型の A 群ロタウイルスによる感染性胃腸炎集団事例, 2016 年—大阪市, 病原微生物検出情報 月報 37(No.437), 21-22 (2016)
- (10) 宗村佳子, 木本佳那, 小田真悠子, 奥津雄太, 秋場哲哉, 貞升健志, IASR, 38(1):5-6(2017)
- (11) 宗村佳子: 東京都におけるノロウイルス検出状況(2015), 食品衛生学雑誌, 57(6):194-96(2016)
- (12) 入谷展弘, 改田 厚, 山元誠司, 上林大起, 阿部仁一郎, 久保英幸, 野田 衛, 西尾孝之, 小笠原 準: 市販生カキにおけるウイルス汚染調査(2010-2011~2015-2016 シーズン), 大阪市立環境科学研究所報告 調査・研究年報 78, 1-6 (2016)
- (13) 入谷展弘, 上林大起, 改田 厚, 阿部仁一郎, 中村寛海, 山元誠司, 久保英幸, 小笠原 準, 伯井紀隆, 森 宏美, 坂本徳裕, 廣川秀徹, 松本健二, 吉村高尚, 土見日出夫, 喜多直哉, 伊藤大樹, 野田 衛: 集団胃腸炎事例からのノロウイルス GII. P16-GII. 4 Sydney_2012 の検出—大阪市, 病原微生物検出情報 月報 37(No.437), 18-20 (2016)
- foods by a PANtrap method. 第 11 回日中国際ウイルス学会, 2016, 観音寺
- (2) Hiroyuki Saito, Yuko Shimizu, Hiroko Sato, Wakako Akino, Satoshi Hayakawa and Hiroshi Usijima : Immunological response in a patient of norovirus GII.P17-GII.17 infection. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 2016, 札幌
- (3) Ushijima H., Saito H., Shimizu Y., Sato H., Thongprachum A., Khamrin P., Okitsu S., Takanashi S., Maneekarn N. and Hayakawa S. : Immune response against different genotypes of noroviruses in two adults with the recurrent infection. 第 6 回国際カリシウイルス学会, 2016, Savannah
- (4) 芦塚由紀, 吉富秀亮, 中村麻子, 小林孝行, 濱崎光宏, 世良暢之, 梶原淳睦, 清水良平, 岡本健太郎, 友枝哲宏, 森 一也, 松尾寿子, 野田 衛 (2016) 飲用水からノロウイルスが検出された食中毒事例, 第 37 回日本食品微生物学会学術総会, 江戸川区, 9/15
- (5) 今野貴之, 高橋志保, 熊谷優子, 斎藤博之: サルモネラの血清型別への遺伝子検査法からのアプローチ, 第 27 回秋田応用生命科学研究会講演会, 2016, 秋田
- (6) 斎藤博之, 佐藤寛子, 早川智, 牛島廣治: ノロウイルス GII. P17-GII. 17 に再感染した症例における免疫応答,

2. 学会発表

- (1) Hiroyuki Saito, Miho Toho, Mamoru Noda, Tomoyuki Tanaka: Noroviruses RNA detection in contaminated

- 第 57 回日本臨床ウイルス学会, 2016, 郡山
- (7) 斎藤博之, 秋野和華子, 佐藤寛子, 清水優子, 早川智, 牛島廣治: ノロウイルス GII. 17 感染に伴う免疫応答と病原性に関する一考察, 秋田応用生命科学研究会第 28 回講演会, 2016, 秋田
- (8) 斎藤博之, 秋野和華子, 野田衛: ノロウイルス遺伝子型別の効率化に関する検討, 第 37 回日本食品微生物学会学術総会, 2016, 東京
- (9) 斎藤博之, 秋野和華子, 野田衛: 疫学的視点から見たノロウイルス GII. P17-GII. 17 型の病原性に関する一考察, 第 112 回日本食品衛生学会学術講演会, 2016, 函館
- (10) 三元昌美, 上間 匡, 野田 衛 (国立医薬品食品衛生研究所) (2016) 市販用カキのノロウイルス, F-フェージ, 細菌(細菌数, E. coli 最確数)の汚染状況の比較, 第 112 回日本食品衛生学会学術講演会, 函館市, 10/28
- (11) 三元昌美, 上間 匡, 野田 衛 (2016) プラーク法によるカキからの F-フェージ検出法の検討, 第 37 回日本食品微生物学会学術総会, 江戸川区, 9/15
- (12) 山元誠司, 改田 厚, 上林大起, 久保英幸, 入谷展弘: 2015/16 シーズンに大阪市内で流行したロタウイルス A (G2P[4]株) の遺伝子解析, 第 64 回日本ウイルス学会, 札幌 (2016. 10. 23-25)
- (13) 宗村佳子: 東京都におけるノロウイルス検出状況 (2015). 第 111 回食品衛生学会学術講演会シンポジウム
- (14) 秋野和華子, 斎藤博之, 野田 衛 (2016) 市販生カキからのノロウイルス・サポウイルスの検出と秋田県内における流行状況の推移, 第 37 回日本食品微生物学会学術総会, 江戸川区, 9/15
- (15) 小菅大嗣, 三元昌美, 上間 匡, 小林直樹小西良子, 野田 衛 (2016) 各種負荷剤を用いた市販塩素系消毒剤のネコカリシウイルスに対する不活化効果の比較, 第 37 回日本食品微生物学会学術総会, 江戸川区, 9/15
- (16) 小菅大嗣, 三元昌美, 上間匡, 小林直樹, 小西良子, 野田衛: 低温加熱試験によるノロウイルスの不活化, 第 112 回日本食品衛生学会学術講演会, 2016, 函館
- (17) 上間 匡, 三元昌美, 小菅大嗣, 野田 衛 (2016) 感染性推定遺伝子検査法および次世代シーケンサーを用いたカキからのノロウイルス遺伝子の検出, 第 37 回日本食品微生物学会学術総会, 江戸川区, 9/15
- (18) 上間 匡, 三元昌美, 古山祐輔, 野田 衛 (2016) F-RNA フェージの遺伝子型別法の検討および市販用カキから検出された F-フェージの遺伝子型別, 第 112 回日本食品衛生学会学術講演会, 函館市, 10/27
- (19) 上林大起, 改田 厚, 山元誠司, 久保英幸, 入谷展弘: 手足口病流行へのコクサッキーウイルス A6 の関与,

第 64 回日本ウイルス学会，札幌
(2016. 10. 23-25)

- (20) 谷澤由枝，重本直樹，高尾信一，
野田 衛 (2016)ふき取り検体から
のハイドロキシアパタイトによるノ
ロウイルスの濃縮法の検討，第 37 回
日本食品微生物学会学術総会，江戸
川区，9/15
- (21) 名古屋真弓，板持雅恵，稲崎倫子，
稲畑良，佐賀由美子，米田哲也，野
田衛，滝澤剛則，小渕正次 (2016)メ
タゲノム解析による下水からのノロ
ウイルス・サポウイルス検索，第 64
回日本ウイルス学会学術集会，札幌
市，10/24
- (22) 鈴木達也，渡辺卓穂，中阪聡亮，
梅津麻実，上間匡，野田衛，ノロウ
イルス検査の外部精度管理調査，第
112 回日本食品衛生学会学術講演会，
函館，2016

H. 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