

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」
研究協力報告

ふき取り検体からのノロウイルス検出法の改良及び
ウイルスモニタリングに関する研究

研究協力者 谷澤 由枝 広島県立総合技術研究所 保健環境センター
研究協力者 重本 直樹 広島県立総合技術研究所 保健環境センター
研究分担者 野田 衛 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

食中毒調査の精度向上のため、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。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。開発した方法(改良法)は、①ふき取り時に綿棒等に浸す液およびウイルスの回収の際の再浮遊液に 0.3%Zwittergent 加 PBS (-) を用いる、②核酸抽出に供する試料の量を増やす、の変更を行ったもので、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。この改良法を用いて、公共施設のトイレ周辺における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ところ、便座裏から高率にノロウイルスが検出された。このことから、流行期の公共施設トイレはノロウイルスの感染リスクが高いことが確認された。

A. 研究目的

ウイルス性食中毒発生時の検査では患者便、調理従事者便、原因と疑われる食品の検査に加え、調理施設からのウイルス検出も重要な検査事項である。しかしながら、調理施設のふき取り検体中におけるウイルス量は少量であることも多く、効率的な検出法が必要とされている。平成 25~27 年度に実施された厚生労働科学研究費補助金「食品中のウイルス検出法に関する研究」(H27-1 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-3)において、ふ

き取り検体からのヒドロキシアパタイトによるノロウイルスの濃縮法について検討を行い、一定の回収率を得た。本研究では、更なる検出感度の向上および検査の簡略化を目的として、検査法の改良を検討した。また、人が集まる公共施設のトイレ周辺は、流行期にはノロウイルス感染リスクが高まると考えられるが、具体的なデータがない。そこで、改良法を用いた公共施設のトイレ周辺におけるノロウイルスモニタリング調査を行い、感染リスクを明らかにすることも目的とした。

B. 研究方法

1. ふき取り検体からのノロウイルス検出法の改良

供試材料には、ノロウイルス（遺伝子型 GII. 17）陽性の 10%糞便乳剤を $10^1 \sim 10^3$ 倍に階段希釈した便乳剤を用いた。

滅菌したステンレス製トレイ上の 10 cm×10 cm の区画に希釈した便乳剤 140 μ l を滴下し、コーンラージ棒で塗布した後 60 分間自然乾燥させて模擬検体とした。その後、0.3% Zwittergent 加 PBS(-) に湿らせたふき取り棒 (BM フキトレール A: GSI クレオス) で、縦 10 回、横 10 回、右斜め 5 回、左斜め 5 回を 1 セットとし、ふき取り操作を 2 セット実施した。各希釈につき改良法では 6 区画、以前報告したハイドロキシアパタイト (HAP) 法では 5 区画のふき取りを行った。

改良法および HAP 法の手順にて、ふき取り検体の処理を行った (図 1)。すなわち改良法は、ふき取り棒に回収したウイルスを 0.7 ml の 0.3% Zwittergent 加 PBS(-) に再浮遊させ、その全量を回収して抽出試料とし、その内 280 μ l を用いて RNA 抽出を行なった。RNA 抽出には QIAamp Viral RNA mini Kit (キアゲン) を使用した。抽出 RNA は、PrimeScript RT reagent kit (タカラバイオ) と付属の Random Primer 6mer を用いて逆転写反応を行い、Kageyama ら (J. Clin. Microbiol. 2003) のプライマーおよびプローブを使用して、LC480 probes master (ロッシュ) で増幅し、ウイルスゲノム量を定量した。また、HAP 法は平成 27 年度総括・協力分担報告書「食品中の病原ウイルスの検出法に関する研究」にて報告した方法に従って行った。

模擬検体作成時に塗布した各希釈倍率の糞便乳剤についても核酸抽出および定量を行い、これを塗布量としふき取り検体の回収率を求めた。

2. トイレ周辺におけるノロウイルスモニタリング

平成 28 年 10 月から 12 月の間に、県内の A~I の 9 つの公共施設内トイレを調査対象とした。ふき取りは、洋式トイレ 1 個室につき、便座、内鍵またはドアノブ、ペーパーホルダー、水洗レバーまたは手すりの 4 カ所のふき取りを行い、内鍵またはドアノブ 34 検体、ペーパーホルダー 36 検体、便座裏 38 検体、水洗レバーまたは手すり 32 検体を採取し、試験に供した。

ふき取り検体は採取後、改良法にて処理を行い、cDNA 合成反応を行った後 Nested Real-time PCR 法により陽性・陰性の判定を行った。その内、陽性検体については、Real-time PCR 法による定量および Capsid N/S 領域の遺伝子について Nested PCR 法を実施し、得られた 2nd PCR 産物のダイレクトシーケンスにより、遺伝子配列を決定した。遺伝子型別は、Norovirus Genotyping Tool Version 1.0 (<http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool>) を用いて行った。なお、今回はノロウイルス GII のみを検査対照とした。

(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. 改良法の検出率および回収率

結果を表 1 に示した。 $10^1 \sim 10^3$ 倍に階段

希釈した糞便乳剤を用いて模擬ふき取り検体を作成し、回収率及び、回収限界を調べた。10³コピー程度のウイルスを塗布した場合は、改良法では6区画全て検出され、HAP法では5区画中3区画から検出された。回収率は改良法で34.4%以上、HAP法では23%以上となった。更に10²コピー程度塗布した場合、改良法では6区画中3区画で検出された。

2. ノロウイルスモニタリング

ふき取り場所別、ノロウイルス GII 陽性数及び検出遺伝子型を表2に示した。最も多く検出されたのは便座裏で、38検体中7検体から検出された。また、ペーパーホルダーは36検体中1検体から検出された。検出された遺伝子型は、GII.2が5検体と最も多く、それ以外にGII.6, GII.7およびGII.17もそれぞれ1検体ずつ検出された。

陽性検体の採取日、ふき取り場所およびウイルス定量値を表3に示した。ふき取り検査で陽性となった施設は、9施設中5施設で、施設Cでは3回、施設Hでは2回、調査期間中にノロウイルスが検出された。定量値が最も高い検体は便座裏で6.7×10⁵コピー/検体、最も低い検体はペーパーホルダーで6.0×10²コピー/検体であった。

今回実施した、トイレふき取りによるノロウイルスモニタリング調査でのノロウイルス検出状況と、2016/17シーズンの広島県における定点当りの感染性胃腸炎患者報告数を比較したところ、定点あたりの患者報告数が増加した時期に、トイレのふき取りからノロウイルスが検出されている事が確認された。(図2)

D. 考察

ふき取り検体からのウイルス検出感度の向上および検査時間の短縮を目的とし、検討を行った。昨年度までの検討で、両イオン性界面活性剤である Zwittergent を添加した PBS (-) を、ふき取り液及び再浮遊液に用い、ふき取り操作を2セット繰り返すことで回収率が上昇することを確認していた。今回の改良法では、ふき取り操作後にふき取り棒に付着したウイルスを再浮遊させる液の量を HAP 法の 10ml から 0.7ml に減らし、核酸抽出に供する試料の量を HAP 法の 140 μl から 280 μl に増やすことで、HAP によるウイルスの濃縮行程を省略した。その結果、HAP にノロウイルスを吸着させるための行程である、攪拌1時間が省力可能となった。また改良法では、10³希釈(10²コピー程度塗布)の検体を塗布した場合に6区画中3区画の検出であり、検出限界の向上も認められ、環境中に10²コピー程度ノロウイルスが存在すれば検出可能であると考えられた。

以上の結果より、改良法は迅速で効率的なふき取り検体の処理法として有用である可能性が示唆された。そこで、ノロウイルスのモニタリング調査に改良法を用いることとした。

ノロウイルスのモニタリングでは、県内の公共施設内9施設中5施設のトイレからノロウイルスが検出された。また、その内2施設においては、複数回ノロウイルスが検出されるなど、公共施設トイレが高率にノロウイルスに汚染されていることが明らかになった。ふき取り場所別では、トイレ便座裏は37検体中7検体

からノロウイルスが検出され、ペーパーホルダーからも1検体からノロウイルスが検出されたことから、流行期のトイレは感染リスクがあることが実証された。特に、ペーパーホルダーからノロウイルスが検出されたことから、ペーパーホルダーを介して二次感染が起こる可能性が示された。陽性になったノロウイルスの遺伝子型は、8検体中5検体がGII.2であった。このGII.2は植木ら（IASR 38;17-18, 2017）や松島ら（IASR 38;18-20, 2007）の報告の様に、2016/17シーズンに広島県および全国において低年齢層を中心に流行した遺伝子型であった。更に、広島県における感染性胃腸炎患者報告数と、トイレモニタリング調査の結果を見ても、定点当たりの患者報告数が増加するとトイレふき取りも陽性になっていたことから、トイレの汚染状況はノロウイルスの流行状況を反映していると考えられた。

E. 結論

ふき取り検体からノロウイルスを検出

する際には、再浮遊液の量を減らし、更に核酸抽出に用いる試料を増すことでHAP等による濃縮行程が省略可能で、更に検出感度も向上することを確認した。

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。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 谷澤 由枝, 重本 直樹, 高尾 信一, 野田 衛: 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濃縮法の検討, 第37回日本食品微生物学会学術総会, 2016, 東京

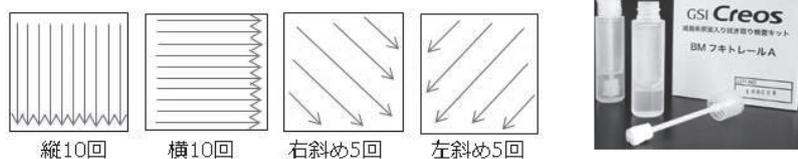
G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得: なし

2. 実用新案登録: なし

3. その他: なし

0.3%Zwittergent加PBS(-)に湿らせたふき取り棒で、
下記のふき取りを2セット実施



使用ふき取りキット：BMフキトレールA
(GSI Creos Corporation)

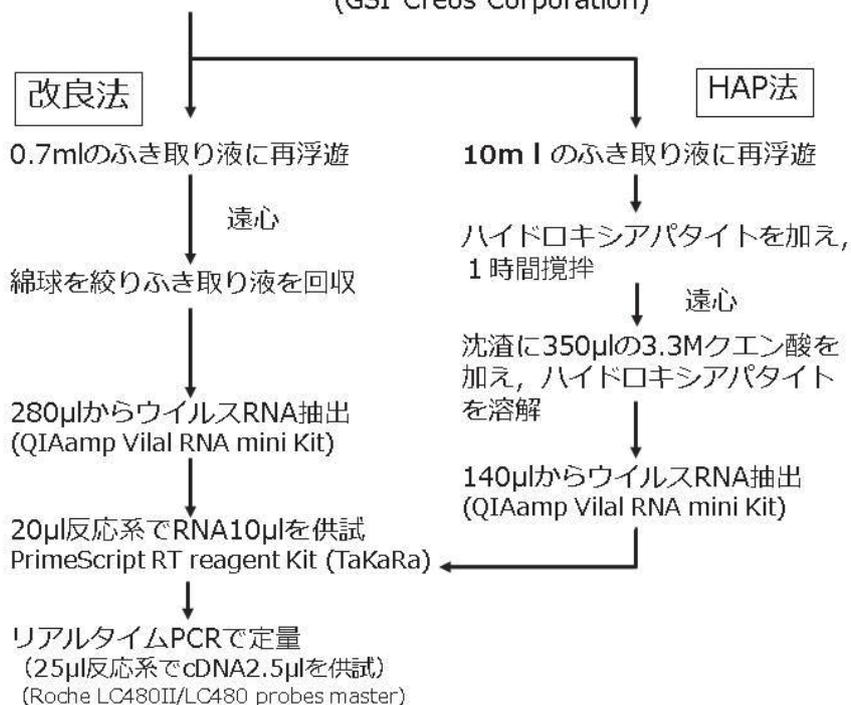


図1 ふき取り方法および改良法・HAP法の検体処理手順

表1 改良法およびHAP法の検出率・回収率

方法	便乳剤希釈率	塗布量 (ゲノムコピー)	検出率 (陽性数/検査数)	回収率 (%)
改良法	原液	$1.7 \sim 2.1 \times 10^5$	6/6	42.1~62.9
	10倍	$2.0 \sim 2.1 \times 10^4$	6/6	38.0~63.7
	100倍	$2.1 \sim 2.7 \times 10^3$	6/6	34.4~111.9
	1000倍	$3.0 \sim 4.8 \times 10^2$	3/6	81.3~134.6
HAP法	原液	2.2×10^5	5/5	24.9~61.7
	10倍	1.5×10^4	5/5	30.4~60.9
	100倍	3.4×10^3	3/5	23.0~32.1

表2 ふき取り場所別NoV GII陽性数及び検出遺伝子型

ふき取り場所	検体数	NoVGII 陽性数	検出遺伝子型 (検体数)
内鍵orドアノブ	34	0	
ペーパーホルダー	36	1	GII.6 (1)
便座裏	38	7	GII.2(5) ,GII.7(1),GII.17(1)
水洗ハ [^] -or手摺	32	0	

表3 NoV GII陽性検体の検体採取日, ふき取り場所及び定量値

遺伝子型	検体採取日	ふき取り場所 (施設記号)	定量値 (10^x -/検体)
	Nov.13	便座裏 (C)	1.1×10^4
	Nov.27	便座裏 (C)	1.0×10^4
GII.2	Dec.3	便座裏 (H)	6.7×10^5
	Dec.4	便座裏 (C)	1.6×10^3
	Dec.10	便座裏 (H)	1.6×10^3
GII.6	Nov.19	ハ [^] -ハ [^] -ホ [^] (D)	6.0×10^2
GII.7	Nov.23	便座裏 (E)	3.4×10^3
GII.17	Nov.27	便座裏 (F)	4.5×10^3

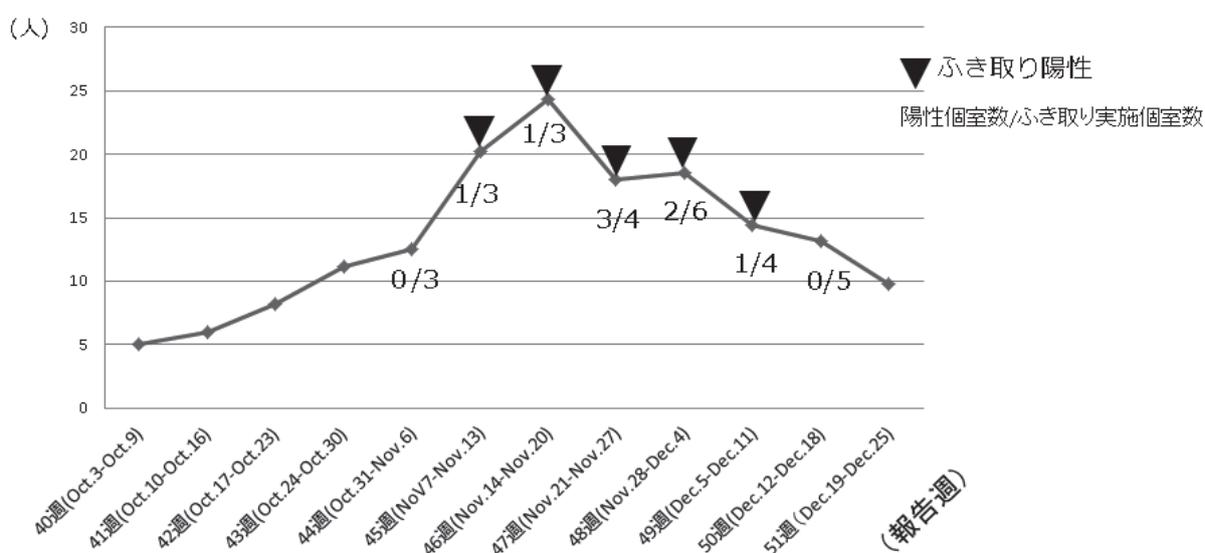


図2 定点当たりの感染性胃腸炎患者報告数（広島県）とふき取り検体からのノロウイルス検出状況