

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

流入水中ノロウイルスの定量および
市販ノロウイルス検出キットの反応性評価

研究協力者	小林 孝行	福岡県保健環境研究所
研究協力者	吉富 秀亮	福岡県保健環境研究所
研究協力者	芦塚 由紀	福岡県保健環境研究所
研究協力者	中村 麻子	福岡県保健環境研究所
研究協力者	梶原 淳睦	福岡県保健環境研究所
研究分担者	野田 衛	国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

ノロウイルス (NoV) の感染予防対策や下水の二枚貝の汚染防止対策の基礎資料とするため、環境検体である終末処理場流入水からの NoV 検出を行った。福岡県においては、2015/16 シーズンは例年と比較して感染性胃腸炎の大きな流行は見られず、同時期の流入水中の NoV GII 検出値も 10^6 コピー/L で一定に推移しており、両者に相関が認められた。感染性胃腸炎の報告数と流入水の NoV 量の動態には 1-2 ヶ月程の時間的な差があると考えられた。また、調理従事者の健康管理対策の一環として、市販 NoV 検出キットについて遺伝子型毎の検出率について評価した結果、一部のキットで GII. 2、GII. 6 に対する反応性が低いものがみられた。

A. 研究目的

ノロウイルス (NoV) は主に冬季に流行し、食中毒や感染性胃腸炎の原因ウイルスの一つとして知られている。NoV の生活環の一つとして、感染者の糞便中に排出された後、トイレから下水を経由し、海水に至り、貝類に蓄積し、再びヒトに感染する一連の循環が知られている。そのため下水中の NoV の動態の迅速な把握は感染拡大の防止や二枚貝の汚染防止に寄与すると考えられる。本研究では、終末

処理場流入水からの NoV 検出状況や汚染量とヒトにおける感染性胃腸炎の発生動向との関連性を明らかにすることを目的とした。

また、調理従事者による食品への二次汚染を原因とする大規模食中毒事例など、消化器症状が回復した後の NoV 感染者や自覚症状の無い NoV 保有者が食中毒の原因となったり、感染拡大に関与することが予防対策上の課題となっている。NoV の糞便検査には、医療機関においてはイ

ムクロマト法が広く用いられている。迅速簡便で安価である一方、検出感度については問題点があることが指摘されている。また、イムクロマト法は NoV に対する抗体を用いているため、遺伝子変異に伴う抗原性の変化の検出感度への影響が懸念される。そこで、市販されている各種の NoV 検出キットについて、糞便検体を用いて遺伝子型ごとの検出感度を比較し、それらの実用性を評価した。

B. 研究方法

1. 材料

終末処理場流入水は 2015 年 11 月から 2016 年 10 月までの期間に、都市部にある A 終末処理場および非都市部にある B 終末処理場から毎月 1 回採取した流入水合計 24 検体を用いた。

市販 NoV 検出キットはメーカーの異なる 3 種類のキット（キット A、キット B、キット C）を使用した。キットの評価には 2013 年から 2017 年の食中毒で搬入され、NoV 陽性となった糞便検体、合計 32 検体を使用した。検体は GI. 2、GI. 3、GII. 2、GII. 3、GII. 4、GII. 6 および GII. 17 の NoV を含むものを使用した。

2. 終末処理場流入水からの NoV 検出法

流入水中のウイルス濃縮は国立感染症研究所が示す「ポリオウイルス感染症の実験室診断マニュアル」に準拠した。すなわち、流入水 1L を良く混和し、4℃で 3000rpm、30 分間遠心し、上清に塩化マグネシウムを添加、pH3.5 に調整後、陰電荷フィルターにウイルスを吸着させ、10mL の 3%ビーフエキストラクト存在下で誘出し、これをウイルス濃縮液とした。NoV

検出は、厚生労働省通知法に準拠し、QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) により RNA 抽出を行い、One Step PrimeScript RT-PCR Kit (Takara) を用いてリアルタイム PCR 法により NoV を定量した。プライマーには COG1F/COG1R および COG2F/COG2R セットを使用した。

3. 市販 NoV 検出キットの反応性評価

糞便検体をリン酸緩衝液 (pH7.5) で約 10%乳剤とし、10,000rpm で 20 分間遠心分離した。この上清から QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて RNA を抽出し、One Step PrimeScript RT-PCR Kit (Takara) を用いてリアルタイム PCR 法により NoV を定量した。また、定量した糞便検体を市販 NoV 検出キットに滴下し、陽性バンドの検出を確認した。

(倫理面への配慮)

本研究では、特定の研究対象者にかかる個人情報を含まないため、倫理面での配慮は不要である。

C. 研究結果

1. 終末処理場流入水からの NoV 検出

流入水からの NoV 検出結果を示した (図 1)。NoV GI は 2016 年 2 月に最も多く検出され、検出値は 5.2×10^4 コピー/L であった。また、NoV GII は 2016 年 6 月に最も多く検出され、検出値は 2.5×10^6 コピー/L であった。

2. 市販 NoV 検出キットの反応性評価

市販 NoV 検出キットについて遺伝子型毎の反応性評価の結果を示した (図 2)。GII. 4 および GII. 17 に対する反応性は、キット A、B および C とともに高かった。

GII. 4 に対する陽性一致率（陽性数/検体数）はそれぞれ 80%、80%、100%であった。また、GII. 17 に対する陽性一致率はそれぞれ 67%、100%、100%であった。一方、GII. 2 および GII. 6 に対する反応性はキット A と B は低く、キット C は高かった。GII. 2 に対する陽性一致率はそれぞれ 27%、18%、72%であった。また、GII. 6 に対する陽性一致率は 20%、20%、100%であった。全検体（32 検体）に対する各キットの陽性一致率はキット A が 47%、キット B が 56%、キット C が 94%であった。

D. 考察

2015/2016 シーズンの福岡県感染症発生動向調査における定点当たりの感染性胃腸炎報告数は例年に比べて少なく、2015 年 11 月のピークの後には減少し、その後は横ばいを続けた。今回の流入水調査においても、NoV 量は例年よりも少なく、検出値は 2015 年 11 月から 2016 年 3 月にかけてほぼ平坦に推移した。このことから、県内の感染性胃腸炎の報告数と流入水中の NoV 量には相関があり、流入水調査は NoV 流行を反映していることが示唆された。また、2015/16 シーズンの NoV GII のコピー数は 10^6 コピー/L で推移したが、2014/15 シーズンの流行期の流入水に含まれる NoV は GI、GII ともに 10^7 コピー/L を超えており、この値が流行の指標値となることが示唆された。

市販 NoV 検出キットの検出感度等について評価を行ったところ、キットの種類によって遺伝子型毎の反応性に違いがみられた。近年流行していた GII. 4 および GII. 17 に対して、今回使用したキットは

いずれも高い反応性を有していることが示された。しかし、キット A および B は 2016/17 シーズンに全国的に流行した GII. 2、および福岡県で多く検出されていた GII. 6 に対する反応性が低かった。このことから、GII. 2 と GII. 6 に対して偽陰性となりやすい市販キットがあることが示唆された。NoV 量が多くても検出できない場合があったが、その要因として便検体に含まれる夾雑物がキットの反応性に影響を与えている可能性が考えられた。また、キット C は 10^7 コピー/mL の GII. 2 糞便検体を検出することができなかったことから、キット C の GII. 2 に対する検出限界は 10^7 コピー/mL である可能性が示唆された。今回の検討により、GII. 2 と GII. 6 の遺伝子型は検出キットにより検出感度が十分では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場合、迅速に市販 NoV 検出キットの評価を行い、問題がある場合には速やかに医療機関や食品事業者等に対し情報提供を行うことが重要である。

E. 結論

- 2015/16 シーズンにおける県内の感染性胃腸炎と NoV 量には相関があり、流入水調査の結果は NoV の流行を反映していた。
- GII. 4、GII. 17 は全てのキットで検出可能であった。しかし、GII. 2 および GII. 6 に対して検出できないキットがあることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

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

2. 学会発表

芦塚由紀、吉富秀亮、野田衛：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, 東京都, 9

月15日, 2016

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

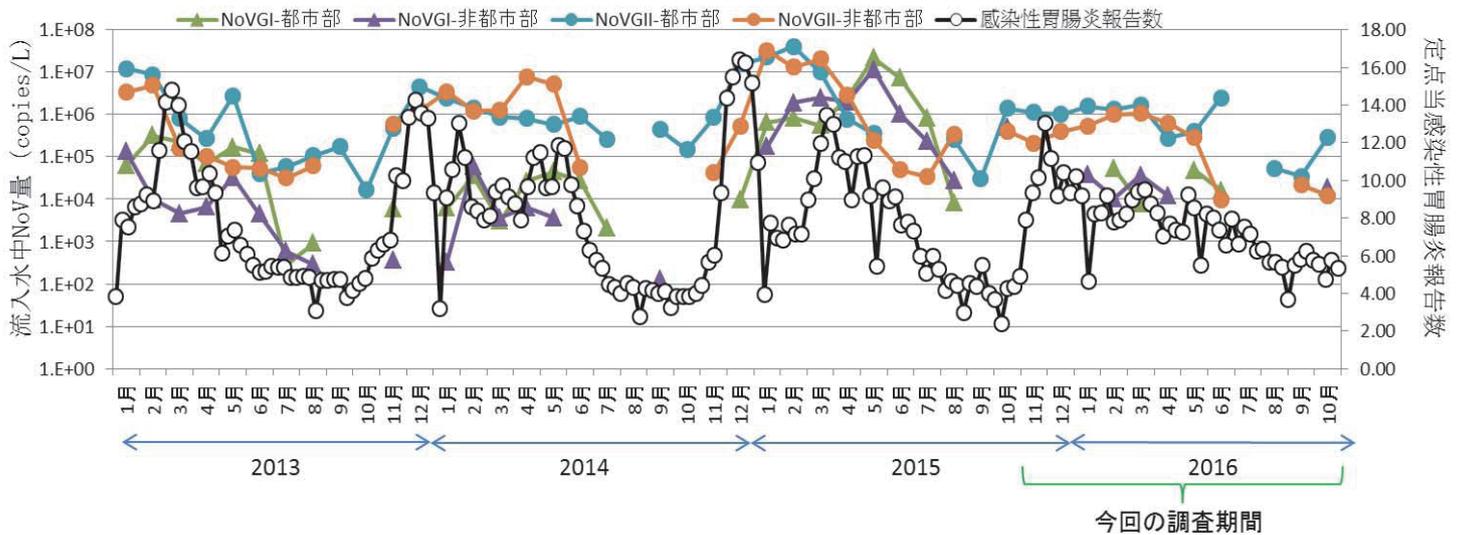


図1 流入水からのNoV遺伝子検出状況と感染性胃腸炎報告数

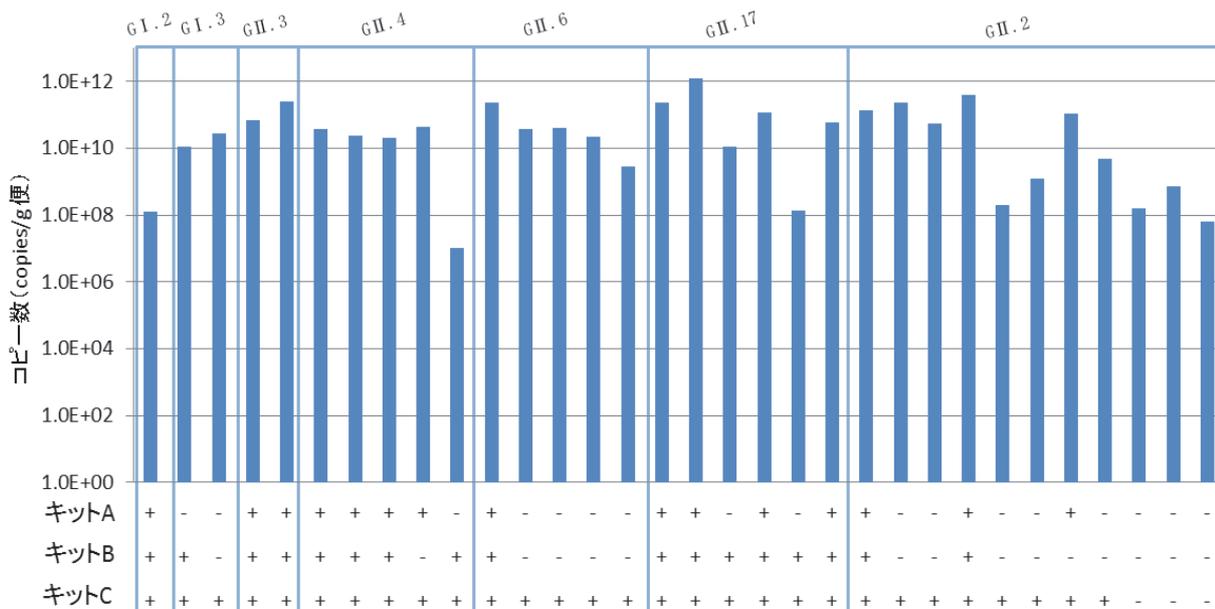


図2 遺伝子型別NoV検出キットの反応性評価結果