

平成 29 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

食中毒検査におけるふき取り検査の精度向上を目的として昨年度までに、ふき取り液に少量の界面活性剤 (Zwittergent) 入り PBS(-) を使用し、濃縮行程無しでも効率的にノロウイルスの検出が可能な方法を開発した。しかし Zwittergent を食品取扱施設で使用することについては、安全性の点で配慮する必要がある。そこで、今年度は代用品として食品添加物に指定されている界面活性剤の使用を検討した結果、Tween20 で一定のウイルス回収率が得られた。更に昨年度に引き続き、公共施設トイレについてふき取りによるノロウイルスのモニタリング調査を実施したところ、2017/18 シーズンは感染性胃腸炎患者が少ない状況を反映し、トイレのノロウイルス汚染は少なかった。

A. 研究目的

ウイルス性食中毒の検査では患者便、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。昨年度の報告書において、少量の界面活性剤 (Zwittergent) 入り PBS (-) でふき取り操作を行ったふき取り検体から、ウイルス濃縮行程を行わず、一定の回収率が得られる事を報告した。しかし、ふき取

り液に加える Zwittergent は食品添加物に指定されておらず、食品取扱施設での使用には検査後のふき取り液の残存などに注意が必要である。そこで、代用品として食品添加物に指定されている界面活性剤の使用について検討を行った。また、検出感度の向上を目的に、核酸抽出キットについても抽出効率の比較検討を行った。

人が集まる公共施設トイレ周辺は、ノロウイルス流行期には感染リスクが高まると考えられるが、これまでに具体的なデータは無かった。そこで、感染リスク

を明らかにすることを目的とし、昨年度に引き続いて、流行期の公共施設トイレにおけるノロウイルスモニタリング調査を実施した。

B. 研究方法

1. 界面活性剤の比較検討

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。昨年度用いた Zwittergent の他に、Tween20（ポリソルベート）、シュガーエステル（シヨ糖脂肪酸エステル）の 2 種類の界面活性剤について比較検討を行った（表 1）。対照として、界面活性剤を加えない PBS（-）のみでのふき取りも行った。

方法（図 1）は、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汚染環境とした。その後、各界面活性剤を含む PBS（-）で湿らせたふき取りキット（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 回のふき取り操作を 2 回繰り返した。次に、ふき取り棒に回収したウイルスを 0.7ml の各界面活性剤を加えた 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。模擬汚染環境作製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、これを塗布量として、ふき取り検体の回収率を求めた。

2. 核酸抽出キットの比較

抽出キットの比較検討には、昨年度までの検討に使用した QIAamp Viral RNA mini Kit、シカジーニクス DNA/RNA プレップキット（関東化学株式会社）、innuPREP Virus RNA Kit（analytik）の 3 種を用いた。方法は、一定量（140 μ l）の糞便乳剤を各抽出キットの最大サンプル処理量まで PBS（-）でメスアップしたものを、模擬検体として核酸抽出を行い、溶出量は 50 μ l とした。抽出 RNA は、前述した方法で逆転写反応を行った後に、リアルタイム PCR 法で定量し、回収率を比較した。

3. トイレ周辺におけるノロウイルスのモニタリング

平成 29 年 10 月から 12 月の間に、県内 6 つの公共施設内トイレを調査対象とした。ふき取りは、0.7ml の 0.3% Zwittergent 加 PBS（-）で湿らせたふき取りキットにて行い、洋式トイレ 1 個室につき、内鍵またはドアノブ、ペーパーホルダー、便座裏の 3 カ所のふき取りを行った。期間内に採取した検体は、内鍵またはドアノブ 32 検体、ペーパーホルダー 32 検体、便座裏 32 検体の合計 96 検体であった。

ふき取り検体は採取後、図 1 の行程に従って処理を行い、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 法による定量と、Capsid N/S 領域の Nested PCR で得られた 2nd PCR 産物のダイレクトシーケンシングにより遺伝子配列を決定した。遺伝子型別は、Norovirus Genotyping Tool Version 2.0 (<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. 界面活性剤の比較検討

各界面活性剤（濃度）の回収率を調べたところ、Zwittergent (0.3%) が最も高く 32.6% - 88.3%、Tween20 (2%) は 10.7-71.5%、Tween20 (2.5%) は 22.7-84.8%、シュガーエステル (0.5%) は 12.4-82.7%、シュガーエステル (1%) は 22.3-80.2%、対照である PBS (-) は 7.8-32.3%であった (図 2)。Tween20、及びシュガーエステルについては 10%から 80%と回収率のバラつきが大きかったものの、PBS (-) と比較すると、ある程度の回収率向上が認められた。ただし、シュガーエステルについては泡沫性が強く扱いにくかった (表 2)。

2. 核酸抽出キットの比較

核酸抽出キットの比較を表 3 に示した。①の 140 μ l 便乳剤中のノロウイルス定量値を各キットの抽出検体中に含まれているウイルス量とし、各キットの回収率を

求めたところ、②の QIAamp Viral RNA mini Kit で 280 μ l のサンプルから抽出した場合は、回収率 86.4%-131.4%、③シカジーニクス DNA/RNA プレップキットは 77.0-115.8%、④innuPREP Virus RNA Kit は 10%未満となった。①、②及び③は同程度の回収率が得られることが判明した。また、検体中のウイルス量を 10²から 10⁴ コピー/検体まで変えて検討を行っても、ウイルス量に関わらず回収率は常に同程度であった。

3. 公共施設トイレにおけるノロウイルスのモニタリング

今シーズン (2017/18 シーズン) の調査で、ノロウイルス GII が検出されたのは、1 検体のみで (表 4)、検出された遺伝子型は、今シーズン小児散発事例および集団感染症事例で多く検出されている GII.4 Sydney_2012 であった (表 5)。ふき取り検査で陽性となった場所は便座裏で、その定量値は 2.07 \times 10³ コピー/検体であった。

今シーズン及び昨シーズンに実施した、公共施設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ウイルス検出状況を、両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のグラフに当てはめたところ (図 3)、昨シーズンは感染性胃腸炎の大きな流行があり、定点あたりの患者報告数の増加した時期にトイレのふき取りからノロウイルスが多く検出されたが、今シーズンは患者数が少なく、トイレのふき取りからの検出も非常に少なかった。

D. 考察

昨年度までの検討結果により、両イオン性界面活性剤である Zwittergent を添加した少量の PBS (－) をふき取り液に用い、核酸抽出に供する試料の量を通常の 140 μ l から 280 μ l に倍増することで、濃縮行程を省略しても、迅速・効率的にノロウイルスを回収可能であることを確認した。しかし、使用している界面活性剤 (Zwittergent) は、人体への影響が懸念されており、調理環境等でふき取りを行う際には、その残存等に関して注意が必要である。そこで、Zwittergent の代用品として食品添加物に指定されている界面活性剤を用いても効率的に、ノロウイルスを回収できるか検討を行った。食品添加物に指定されている、Tween20 (ポリソルベート)、シュガーエステル (ショ糖脂肪酸エステル) について回収率を調べたところ、界面活性剤を添加しない PBS (－) のみでのふき取りと比べ、回収率の向上が認められたものの、Zwittergent にはやや及ばなかった。これは、Zwittergent は両イオン性界面活性剤、一方 Tween20、シュガーエステルは非イオン性界面活性剤であり、性質の違いが回収率に影響しているものと推察された。今回の結果より、食品添加物に指定されている界面活性剤が Zwittergent の代用品として有用である可能性が示唆された。今後は Zwittergent に近い性質を持ち、食品添加物に指定されている界面活性剤で、更に検討を行う必要がある。

核酸抽出キットの比較を行ったところ、シカジーニクス DNA/RNA プレップキットの回収率は、現行で使用している QIAamp Viral RNA mini Kit と同程度の回収率で

あった。シカジーニクス DNA/RNA プレップキットを使用するメリットとして、QIAamp Viral RNA mini Kit よりも作業の行程が少ない点と、キット価格の安さが挙げられる。一方、QIAamp Viral RNA mini Kit を使用するメリットは、自動抽出装置が使用可能であり、多検体処理に向いていることが挙げられる。今回は、PBS (－) で希釈した糞便検体での回収率の検討であったため、今後は Zwittergent 加 PBS (－) でふき取りを行った模擬ふき取り検体等での追加検討を行うなど、より詳細な検討が必要である。

ノロウイルスのモニタリング調査では、県内の公共施設 6 施設内のトイレから、合計 96 検体を採取したが、陽性は便座裏 1 検体のみであった。今シーズンは、広島県内の感染性胃腸炎患者の報告数が例年よりも少なく、ノロウイルス感染者も少なかったと考えられる。昨年度に実施したモニタリング調査では、定点当たりの患者報告数がおおむね警報終息基準値 (定点当たり 12 人) を超えると、ふき取り検体からもノロウイルスが検出される傾向が認められた。2017/18 シーズンは、調査期間中に患者報告数が警報終息基準値を超えることは無かった。検出された遺伝子型については、今シーズンは 1 検体のみではあるものの、小児散発事例および集団感染症事案で多く検出されている遺伝子型 (GII.4 Sydney_2012) が検出された。昨年度も同様に、小児散発事例および集団感染症事案で最も多く検出された遺伝子型 (GII.2) が、トイレのふき取りからも最も多く検出された。この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事が改めて示唆された。

感染性胃腸炎流行期の公共施設トイレはノロウイルスに汚染されている可能性があり、患者数が多くない時期でも常に感染のリスクを意識して利用する必要がある。

E. 結論

ふき取り検体を採取する際に使用する界面活性剤を、食品添加物に変更しても一定の回収率が得られる事を確認した。公共施設トイレのモニタリング調査結果は、市中のノロウイルス流行状況を反映しており、感染性胃腸炎流行期にはトイレを介した感染に注意が必要である。

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ノロウイルス検出法の改良及び公共施設トイレにおけるノロウイルスのモニタリング, 第 38 回日本食品微生物学会学術総会, 2017, 徳島

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

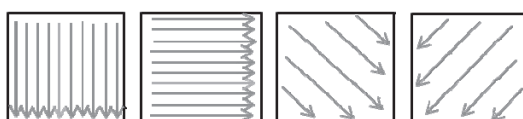
表1 使用した界面活性剤とその特徴

名称	区分	安全性等	HLB**
Zwittergent	両イオン性界面活性剤	タンパク溶解作用 皮膚刺激性, 強い眼刺激	-
Tween20 (ポリソルベート)	非イオン性界面活性剤	食品添加物 ADI* : 10mg/Kg BW/day	16.7
シュガーエステル (シヨ糖脂肪酸エステル)	非イオン性界面活性剤	食品添加物 ADI : 0-30mg/Kg BW/day	16

*ADI: 1日摂取許容量

**HLB: Hydrophilic-Lipophilic Balance (界面活性剤の水と油への親和性の程度を表す値)

ふき取り液 (各界面活性剤入り) に湿らせたふき取り棒で,
ふき取り操作を2セット実施
(1セット: 縦10回, 横10回, 右斜め5回, 左斜め5回)



使用ふき取りキット: BMフキトレールA (GSI Creos)

↓
0.7mlの界面活性剤加PBS (-) に再浮遊

↓ 遠心
綿球を絞りふき取り液を回収

↓
280μlからウイルスRNA抽出
(QIAamp Viral RNA mini Kit)

↓
逆転写反応 (20μl反応系でRNA10μlを供試)
(PrimeScript RT reagent Kit)

↓
リアルタイムPCRで定量 (25μl反応系でcDNA2.5μlを供試)
(Roche LC480II/LC480 probes master)

↓
回収率・検出率を求める

図1 ふき取りおよび検体処理の手順

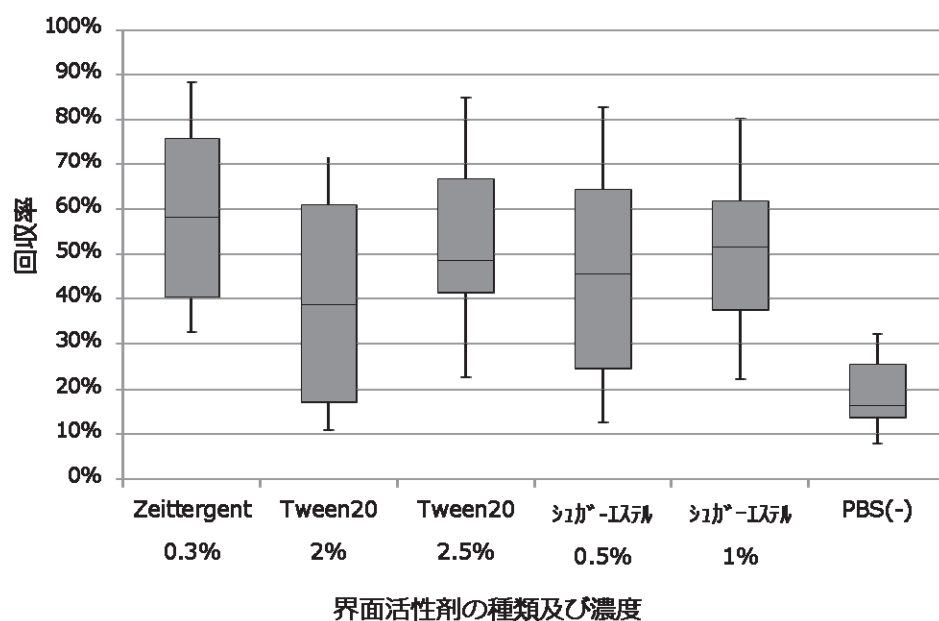


図2 界面活性剤の種類別回収率

表2 界面活性剤の比較

界面活性剤	ふき取り効果	泡沫の発生	食品添加物指定
Zeittergent	◎	+	×
Tween 20	○	+	○
シュガーエステル	○	++	○

表3 核酸抽出キット別回収率

抽出検体の調整	抽出キット	抽出量 (μl)	溶出量 (μl)	回収率 (①の定量値との比較)
① 便乳剤	QIAamp Viral RNA mini Kit	140	50	-
② 便乳剤140μlを280μlにメスアップ	QIAamp Viral RNA mini Kit	280	50	86.4-131.4%
③ 便乳剤140μlを300μlにメスアップ	シカジーニアスDNA/RNAプレップキット	300	50	77.0-115.8%
④ 便乳剤140μlを300μlにメスアップ	innunPREP Virus RNA Kit	300	50	10%未満

表4 ふき取り場所別NoV GII陽性数

ふき取り場所	検体数	NoVGII 陽性数
内鍵orドアノブ	32	0
ペーパーホルダー	32	0
便座裏	32	1

表5 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	定量値 (10^3 -/反応)
GII.4 Sydney_2012	Nov.26	便座裏	2.07×10^3

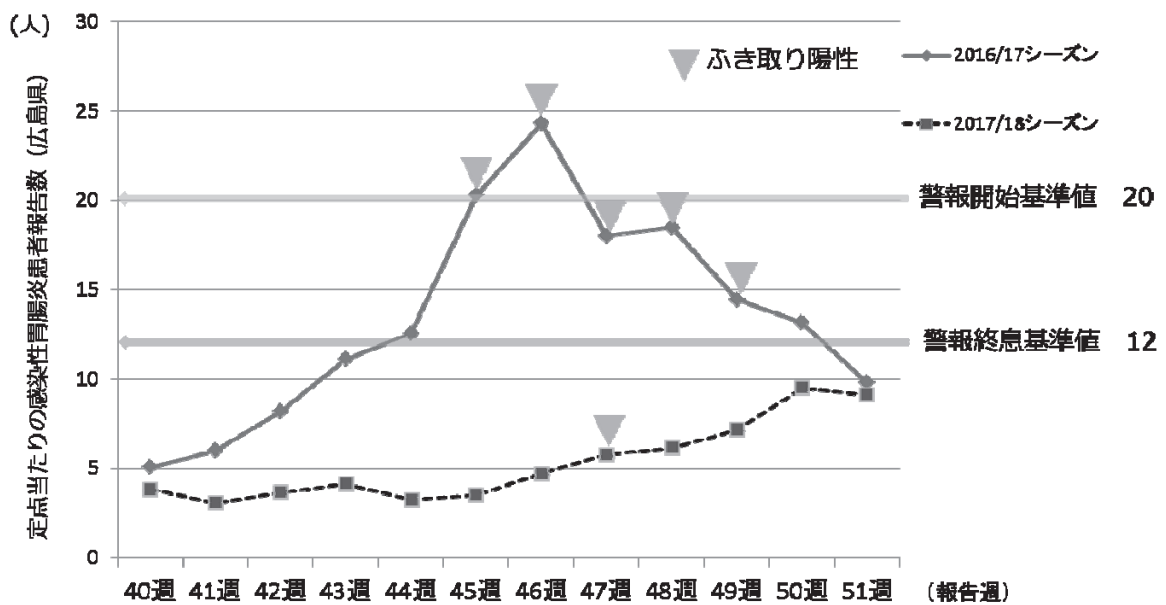


図3 定点当たりの感染性胃腸炎患者報告数（広島県）とふき取り検体からのノロウイルス検出状況