

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 30 年度 総括・研究分担報告書

研究代表者 上間 匡

平成 31 (2019) 年 3 月

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 30 年度 総括研究報告書

研究代表者 上間 匡

平成 31 (2019) 年 3 月

平成 30 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 上間 匡 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およ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

9 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、食品検体では昨年度より変動係数が大きくなったが、概ね良好な結果が得られた。

パンソルビン・トラップ法において、試薬の品質や操作ミス等による回収率低下を客観的にモニターできるように内部標準物質の導入に関して検討し、CA2 を添加することで、回収率の評価が可能となった。ふき取り検体からのノロウイルス検出改良法について、Nested-リアルタイム PCR 法での判定基準の策定とウイルス核酸抽出時に使用するキットの検討を行い、Nested-リアルタイム PCR 法での判定は、2<sup>nd</sup> PCR のリアルタイム PCR 反応サイクルを 30 サイクルとし、Cp 値 25 以下で検出された検体を陽性とする事とした。また、核酸抽出キットに NucleoSpin Virus を用いることにより、遺伝子検査時の PCR 反応に持ち込めるウイルスゲノム量の改善が図られた。1,735 検体を対象に nested リアルタイム PCR を実施した結果、87 検体が陽性となったが、うち 41 検体は通常のリアルタイム PCR では未検出であったため、食中毒事例における原因食品および感染経路の究明のためには、nested リアルタイム PCR による検査が有用であると考えられた。

ヒトサポウイルス (hSaV) の培養条件を検討した結果、新たな株化細胞のうち 1 株で非常に良好なウイルス増殖性が認められ、これまで増殖確認ができなかったウイルス RNA 低コピーの検体でも、培養上清でのウイルス RNA 増大が確認できた。また hSaV 抗原検出 ELISA 系の構築を試み、GI および GII で良好な結果が得られた。

感染経路究明における調理従事者由来ウイルス遺伝子解析の有用性について検討し、今回解析したすべての事例で患者由来株と遺伝子型、塩基配列が一致していたことから、患者の所在地が他自治体のみの場合でも有用であることが示された。食中毒等の発生時に詳細な分子疫学的解析を行うため、N/S 領域解析よりも有用な手法として、NoV GII の中で検出数の多い 6 遺伝子型(GII.2, GII.3, GII.4, GII.6, GII.14, GII.17)の ORF2 全長遺伝子を網羅的に増幅可能な PCR 系を構築し、各遺伝子型に対応す

るシーケンス解析用プライマーも設計した。集団胃腸炎事例の遺伝子解析により、同一発症者集団においては1塩基の置換は起こり得ることが示唆された。食中毒疑い事例の患者、調理従事者、食品等から検出されたノロウイルス遺伝子の塩基配列の比較において、RdRp-VP1全長配列での一致状況の確認が感染源等の特定の裏付けとして有用であると考えられた。ノロウイルスの集団事例において、症状の有無別で便中のノロウイルスコピー数を比較した場合、顕性感染者は不顕性感染者より有意に高いことが分かったが、不顕性感染者の排泄するウイルスコピー数もまた、十分に感染を拡大させる量であり、集団発生等における感染源となる可能性が示唆された。

河川に生息するシジミについてノロウイルス（NoV）検査を行い、ヒトでの流行遺伝子型と比較し、関連性について調査した結果、GII群では、近年のヒトにおける流行遺伝子型を反映する結果が得られた。岩ガキと下水から検出されたNoVの遺伝子型から、汚染状況は市中の流行と相関する可能性が示唆された。2018年12月に市販されていた生食用カキにNoVおよびA型肝炎ウイルス汚染は認められなかった。流入下水52検体を対象にNoVおよびサポウイルス（SaV）遺伝子を定量的に検出した結果、NoV、SaVともに遺伝子は通年検出され、SaVはNoVよりも高い濃度で検出された。下水サンプルを用いて腸管感染ウイルスの検出を行った結果、NoV以外にもSaV、AsV、AiV、HAVが検出されたことから、下水サンプルを用いた流行解析により、流入地域におけるウイルスの流行状況の包括的把握が可能であると考えられる。

## 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、手洗いする方法について、10人の被験者の協力のもと実際の手洗いを模して検証した結果、その有用性が示された。ネコカリシウイルスおよびマウスノロウイルスを用いて、天然生理活性物質235化合物について抗ノロウイルス活性の評価を行ったところ、抗ウイルス活性を示した23化合物のうち1化合物が、両ウイルスに対して活性を示した。ヒトノロウイルス不活性化評価にかかる代替ウイルスの候補3種類のうちコクサッキーA6型ウイルスについて、Gdula株と近年分離株間でのアルコール製剤感受性を比較し、Gdula株を選定した。加熱調理によるウイルスの不活化について検討したところ、シカ肉にスパイクしたコクサッキーB5型ウイルスの湯煎による3log以上の不活化には、60°C30分、55°C60分以上の加熱が必要で、50°Cでは90分の加熱でも効果がないことが示された。実際の調理方法（スチームオーブン、フライパン）を用いた場合、75°C1分、68°C5分、65°C15分の加熱で3log以上の不活化が確認できた。

研究分担者

高木 弘隆

国立感染症研究所

斎藤 博之

秋田県健康環境センタ

ー

渡辺 卓穂	一般財団法人食品薬品 安全センター	渡部 香	同上
		広川 智香	同上
野田 衛	国立医薬品食品衛生研 究所	新井 礼子	同上
		宗村 佳子	東京都健康安全研究セ ンター
<b>研究協力者</b>		永野 美由紀	同上
岡 智一郎	国立感染症研究所	浅倉 弘幸	同上
中阪 聡亮	一般財団法人食品薬品 安全センター	小田 真悠子	同上
吉澄 志磨	北海道立衛生研究所	新開 敬行	同上
後藤 明子	同上	清水 智美	川崎市健康安全研究所
大久保 和洋	同上	若菜 愛澄	同上
石田 勢津子	同上	清水 英明	同上
筒井 理華	青森県環境保健センタ ー	入谷 展弘	大阪健康安全基盤研究 所
		山元 誠司	同上
福田 理	同上	改田 厚	同上
秋野 和華子	秋田県健康環境センタ ー	平井 有紀	同上
		江川 和孝	同上
佐藤 寛子	同上	馬場 孝	同上
清水 優子	日本大学・医学部・微生 物学教室	阿部 仁一郎	同上
牛島廣治	同上	久保 英幸	同上
高橋 知子	岩手県環境保健研究セ ンター	三好 龍也	堺市衛生研究所
		中谷 誠宏	同上
川上 修央	同上	岡山 文香	同上
藤森 亜紀子	同上	福井 陽子	同上
佐藤 卓	同上	内野 清子	同上
高橋 雅輝	同上	山本 憲	同上
岩渕 香織	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
梶田 弘子	同上		
植木 洋	宮城県保健環境センタ ー	重本 直樹	同上
		藤井 慶樹	広島市衛生研究所
坂上 亜希恵	同上	福永 愛	同上
田村 務	新潟県保健環境科学研 究所	則常 浩太	同上
		兼重 泰弘	同上
西田 晶子	同上	坂本 綾	同上
		小林 孝行	福岡県保健環境研究所

吉富 秀亮 同上  
中村 麻子 同上  
芦塚 由紀 同上  
永田 文宏 国立医薬品食品衛生研  
究所

(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、遺伝子の変異し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およ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9機関を対象として、7検体〔ウイルス懸濁液：3検体、食品：3検体(3検体はいずれも同一濃度)および陰性検体：1検体〕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) 食品・拭き取りからのウイルス検出法の改良・開発

##### ① パンソルビン・トラップ法の内部標準物質の検討

試薬の品質や操作ミス等による回収率低下を客観的にモニターできるように、内部標準物質(A群コクサッキーウイルス2, 6, 16型およびエコーウイルス9型)の検討を行った。

##### ② ふき取り検体からのノロウイルス検出法の改良

Nested-リアルタイムPCR法によるウイルス判定基準の策定、ウイルス核酸抽出キットの性能比較および、ふき取り検体からのウイルス検出比較試験を行った。

### ③ NestedリアルタイムPCRを用いた食品および拭き取りからのノロウイルス検出率の向上

2016および2017年度におけるノロウイルス（NoV）食中毒（疑いを含む）事例の調査で搬入された食品と拭き取り1,735検体を対象に、nestedリアルタイムPCRを実施した。

#### (3) サポウイルスおよびノロウイルスの培養法の確立

新規細胞株についてhSaV陽性検体を接種し、培養上清中のウイルスRNA検出および定量を行った。また、RNA定量済み陽性検体をcontrolとして、抗血清の組合せ、固相及びsandwich抗血清濃度を決定し、マイクロプレートELISAによる培養上清中の抗原検出を試みた。

#### (4) 食中毒調査における遺伝子解析の現状と課題

##### ① 調理従事者および患者から検出されたノロウイルスの遺伝子解析

調理従事者からノロウイルス（NoV）が検出された食中毒（疑いを含む）を対象に、患者由来NoVとの遺伝子解析を実施した。

##### ② ノロウイルスGⅡのORF2全長遺伝子解析手法に関する検討

N/S領域解析よりも配列情報量の多い解析を行うため、可変領域であるP2ドメインを含むORF2全長（約1680塩基）の塩基配列解析手法について検討を行った。検体からのRNA抽出工程を改良し、抽出した

RNAの濃縮工程を加えるとともに、最適な逆転写反応系の検討を行った。また、PCRにおいては、ORF2全長遺伝子を増幅するために、既知のプライマーに加えて、ORF2の終止コドン付近にユニバーサルプライマーを新しく設計した。

##### ③ 集団胃腸炎事例から検出されたノロウイルスの分子疫学解析

2012年9月～2018年8月（2012/13～2017/18シーズン）に青森県内で発生した集団胃腸炎事例のうち、調理従事者からノロウイルスが検出された食中毒15事例の遺伝子解析を行った。

##### ④ 食中毒疑い事例のノロウイルス検査における検出用プライマー内配列の一致状況の解釈に関する検討

食中毒疑い事例の患者、調理従事者、食品等から検出されたノロウイルス遺伝子の塩基配列の比較において、これまで用いていたものよりも長い配列（RdRp-VP1全長）での一致状況を検証した。

##### ⑤ ノロウイルス集団発生事例の動向と不顕性感染者の実態について

2015年1月～2018年5月のノロウイルスが検出された集団発生事例（114事例）の感染者（525名）のうち、不顕性感染者を含む事例（20事例）の感染者（135名）を症状の有無別で便中のノロウイルスコピー数を比較した。

#### (5) 疫学、汚染実態調査

##### ① 二枚貝のノロウイルス検出状況

川崎市内の河川に生息するシジミについてノロウイルス（NoV）検査を行い、ヒトでの流行遺伝子型と比較し、関連性について調査した。

## ② 岩ガキと生産海域における下水からのノロウイルスの検出

2018年6月～8月に購入した秋田県産の岩ガキ（各月10検体）と2018年4月～12月に採取した下水（各月1回採水）について、ノロウイルス（NoV）の検出を行った。

## ③ 生食用カキのノロウイルス汚染調査

生食用カキのNoVおよびHAV汚染調査  
2018年12月に市販されていた生食用カキ3ロットをNoVの検出に用いた。

## ④ 感染性胃腸炎起因ウイルスの挙動と流行状況

2014/2015シーズンから2018/2019シーズンに宮城県内で検出されたノロウイルス（NoV）について、遺伝子型を比較した。また、2018年1月から2018年12月に採取した流入下水52検体を対象にNoVおよびサポウイルス（SaV）遺伝子を定量的に検出した。

## ⑤ 下水サンプルを用いた腸管感染ウイルスの流行解析

腸管感染ウイルスについて、下水サンプルを用いてウイルスの遺伝子検出を行い、臨床サンプルからの結果と合わせて分子疫学的解析を行った。

## 2. 調理従事者からの二次汚染防止に関する研究

### (1) 効率的な手洗いの方法の検討

ノロウイルスの代替ウイルスとして、大腸菌のMS2ファージを使用して、汚染前の水溶性高分子ポリマーによる手指のコーティングが、手洗い後に手に残存するウイルス汚染を減らす効果があるかどうかを、10人の被験者を用いて実際の有効性を評価した。

## (2) ノロウイルスの不活化に関する研究

ノロウイルス（NoV）の感染予防対策に寄与する化合物の探索を目的に、ネコカリシウイルス（FCV）およびマウスノロウイルス（MNV）を用いた抗NoV活性を有する化合物の活性評価を行った。

## (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

ヒトノロウイルス代替ウイルスの選定において、Coxsackievirus type A6を導入し、基本4製剤に加え、有機酸2種と市販アルコール製剤5種に対する感受性を検証した。また、Gdula株と近年分離株について、3製剤での感受性差を確認した。

## (4) 加熱調理によるウイルスの不活化

病原性ウイルスの低温加熱調理による低減効果について、ネコカリシウイルスよりも耐熱性のあるコクサッキーウイルスB群5型（CB5）とシカ肉等を用いて検討を行った。シカ肉およびイノシシ肉にウイルスを接種後、加熱調理し、CB5感染価の測定および、遺伝子の定量を行った。

### (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、個人情報を厳格に管理、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

検量線作成では 2 回の測定でばらつきは認められなかった。また、標準 DNA 溶液では実測値における変動係数が 0.015 と昨年度より大きくなったものの非常に小さいものであり、精度良く PCR 操作が実施されているものと考えられた。一方、ウイルス懸濁液では昨年度と同様に変動係数は約 0.1 であった。さらにきな粉を基材とした食品検体では、濃縮工程を含めた外部精度管理調査を行ったところ、変動係数は従来方式において 0.5~0.6 を示した。

(渡辺研究分担報告)

#### (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・トラップ法の内部標準物質の検討

内部標準物質の候補に挙げた 4 種類のウイルスの内、CA2 の回収率が最も高かったため、CA2 を内部標準物質として添加し、検査対象である NoV と同時に回収・定量したところ NoV と CA2 の回収率比は食品の種類に関わらず 2~3 倍であった。

(斎藤研究分担報告)

##### ② ふき取り検体からのウイルス検出法の改良

Nested-リアルタイム PCR 法での判定は、2<sup>nd</sup> PCR のリアルタイム PCR 反応サイクルを 30 サイクルとし、Cp 値 25 以下で検出された検体を陽性とする事とした。また、核酸抽出キットに NucleoSpin Virus を用いる

ことにより、遺伝子検査時の PCR 反応に持ち込めるウイルスゲノム量の改善が図られた。

(谷澤研究協力報告)

##### ③ NestedリアルタイムPCRを用いた食品および拭き取りからのノロウイルス検出率の向上

87 検体が Nested リアルタイム PCR で NoV 陽性となった。87 検体の中で、41 検体は通常のリアルタイム PCR では未検出であった。

(宗村研究協力報告)

##### (3) サポウイルスおよびノロウイルスの培養法に関する検討

新規細胞株のうち、特に 2 種類の細胞株において、前年度のものと比較して、より強いウイルス RNA シグナルが確認された。Mc114-GI.1 及び Syd53-GIV.1 で良好な希釈直線を得られることが示された。また当該 Ag 検出 ELISA により今回検討した新規細胞を用いて調製した hSaV-GI.1 及び GII.3 の培養上清から高濃度の各抗原が検出された。

(高木研究分担報告)

##### (4) 食中毒調査における遺伝子解析の現状と課題

##### ① 調理従事者および患者から検出されたノロウイルスの遺伝子解析

調理従事者からノロウイルス (NoV) が検出された食中毒 (疑いを含む) を対象に、患者由来 NoV と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 NoV の遺伝子型、塩基配列が一致した。

(入谷研究協力報告)

## ② ノロウイルスGⅡのORF2全長遺伝子解析手法に関する検討

NoV GⅡの中で、検出数の多いGⅡ.2, GⅡ.3, GⅡ.4, GⅡ.6, GⅡ.14, GⅡ.17のORF2全長遺伝子を網羅的に増幅可能なPCR系を確立した。さらに、各遺伝子型のシーケンス解析に必要なプライマーについても新たに設計した。

(藤井研究協力報告)

## ③ 集団胃腸炎事例から検出されたノロウイルスの分子疫学解析

2017/18シーズンに発生した事例番号15では、発症者便由来のGⅡ.4 Sydney\_2012のうち1株が、調理従事者便由来株と1塩基異なっていた。

(筒井研究協力報告)

## ④ 食中毒疑い事例のノロウイルス検査における検出用プライマー内配列の一致状況の解釈に関する検討

対象事例の多くはRdRp-VP1全長の比較でも検体間の配列が一致するという状況から大きくは逸脱していなかった。一方で、RdRp-VP1全長の比較により、検出用プライマー内配列の比較では見えなかった不一致が多く検出された事例も一部確認された。

(吉澄研究協力報告)

## ⑤ ノロウイルス集団発生事例の動向と不顕性感染者の実態について

症状の有無別で便中のノロウイルスコピー数を比較した場合、顕性感染者は不顕性感染者より有意に高いことが分かった。遺伝子型別の比較では、ウイルスコピー数に有意な差は認められなかった。

(高橋研究協力報告)

## (5) 疫学、汚染実態調査

### ① 二枚貝のノロウイルス検出状況

2017年8月、10月、2018年2月、6月、8月、10月、11月、12月に採取したシジミ156検体中51検体からNoVが検出され、NoV保有率(陽性率)は32.7%であった。

(清水研究協力報告)

### ② 岩ガキと生産海域における下水からのノロウイルスの検出

岩ガキについては、6月はGⅡが6検体、GⅠが4検体から検出された。7月はGⅡが3検体、GⅠが7検体から検出された。8月はGⅡのみ1検体から検出された。

GⅡは11月の放流水を除くすべての検体から、GⅠは10月の放流水を除くすべての検体から検出された。

2017/2018シーズンの秋田県における食中毒事例は、1事例のみでNoV GⅡ.4が検出された。集団感染事例および感染症発生動向調査において検出されたNoVの遺伝子型は、GⅡ.2が最も多く、4月、5月に検出数が増加していた。

(斎藤研究協力報告)

### ③ 生食用カキのノロウイルス汚染調査

検査したすべてのカキからNoVおよびHAVは検出されなかった。

(入谷研究協力報告)

### ④ 感染性胃腸炎起因ウイルスの挙動と流行状況

GⅡ.4が全てのシーズンを通じて最も多く検出された。一方、シーズンによってはGⅡ.2, GⅡ.17による流行も確認された。

流入下水中のNoVはほぼ通年検出され、特にNoVGⅡ群の遺伝子濃度は感染性胃腸

炎の流行を反映していた。加えて、SaVもNoVと同様に通年検出され、2018年は昨年に引き続きNoVよりも高濃度で検出された。

(植木研究協力報告)

## ⑤ 下水サンプルを用いた腸管感染ウイルスの流行解析

NoVについては、臨床サンプルと下水サンプルから検出される遺伝子型に相関がみられ、下水から高頻度に検出される遺伝子型が臨床サンプルから検出された。一方、2017/18シーズンはNoVによる感染性胃腸炎患者や食中毒の発生の報告は少数であったが、下水中のNoV遺伝子量は高値であった。

サポウイルス等の臨床サンプルから検出の少ない下痢症ウイルスについても下水サンプルからは高頻度に検出された。

2018年12月にA型肝炎ウイルスが下水サンプルから検出された。遺伝子解析の結果から同年5月の急性肝炎症例のHAVと近縁のウイルスであった。

(三好研究協力報告)

## 2. 調理従事者からの二次汚染防止に関する研究

### (1) 効率的な手洗いの方法の検討

被験者の両手を $8 \times 10^7$ 個のファージで汚染し、次の4つの試験、A:手洗い無し、B:水で手洗い、C:ハンドソープによる手洗い、D:3%カルボキシメチルセルロースの45%エタノール液(CMC液)によるコーティング後にファージで汚染し水洗い、を実施して、両手に残ったファージをグローブジュース法で回収し、回収したバッファー中のファージ濃度を定量し

た。回収液中のファージ濃度の平均は、A:6.6log<sub>10</sub>pfu/ml、B:5.5log<sub>10</sub>pfu/ml、C:4.7log<sub>10</sub>pfu/ml、D:4.5log<sub>10</sub>pfu/mlで、CとDに有意差は無いもののDが最も濃度が低かった。

(田村研究協力報告)

### (2) ノロウイルスの不活化に関する研究

天然生理活性物質235化合物を対象に抗NoV活性の評価を行った結果、1化合物(化合物Aとする)が両ウイルスに対する抗ウイルス活性を示した。次に化合物Aについて精査したところ、細胞生存率を指標とする抗ウイルス活性は両ウイルスに対して18μMで最大を示した。また、濃度依存的なウイルス感染価の抑制がみられ、24時間の培養でFCVとMNVそれぞれに対して14.4μMで4.56log<sub>10</sub>、5.83log<sub>10</sub>感染価が抑制された。

(小林研究協力報告)

### (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

CA6については、市販アルコール製剤2種を除き、感受性は認められなかった。またGdula株と近年分離株について、感受性差を確認したところ、株間差が認められた。

(高木研究分担報告)

### (4) 加熱調理によるウイルスの不活化

シカ肉の加熱調理(湯煎)において、60°C30分、55°C60分以上で、CB5については、3log以上の不活化が確認できたが、50°Cでは90分の加熱でもウイルス感染価の減少は1log未満であり、ウイルスをほとんど不活化出来ないと考えられた。

調理方法を変えた場合(フライパンや

オーブンを用いて焼くなど) や、約 80～230g 程度の重量を用いた場合について検討したところ、75°C1分、68°C5分、65°C15分の加熱により 3log 以上の不活化が確認できた。

(野田研究分担報告)

## D. 考察

### 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

国際的に推奨されているロバスト統計量を算出したところ、変動係数はウイルス懸濁液では約 0.12、模擬食品検体では 0.6 となり、昨年度より大きくなった。これは、昨年度とロットの違う検体を用い、実施者も違っていたことが原因と推察された。しかし、食品検体を採用することで、変動係数は大きくなるものの、参加機関を評価するには許容できるばらつきであると考えられた。

(渡辺研究分担報告)

#### (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・トラップ法の内部標準物質の検討

食中毒事例で搬入された食品検体に CA2 を一定量添加し、その回収率を評価することで、検査精度を担保(「陰性」は本当に陰性である)等) することが可能となった。

(斎藤研究分担報告)

##### ② ふき取り検体からのウイルス検出法の改良

一連のふき取り操作から Nested-リアルタイム PCR 法での検出限界は、100cm<sup>2</sup>

あたり 10<sup>3</sup> ゲノムコピーオーダー程度であると推察された。

(谷澤研究協力報告)

### ③ NestedリアルタイムPCRを用いた食品および拭き取りからのノロウイルス検出率の向上

今回の検討では、通常のリアルタイム PCR では未検出であっても、Nested リアルタイム PCR を実施することで陽性と判定される検体が存在することが明らかとなった。今後、食品や拭き取り検体からより確実に NoV を検出していくためには、nested リアルタイム PCR による検査を積極的に実施していくことが望ましいと考えられた。

(宗村研究協力報告)

### (3) サポウイルスおよびノロウイルスの培養法に関する検討

ヒトサポウイルスの培養検討において新規株化細胞を用いたところ、細胞 B において、非常に良好なウイルス増殖性が認められ、これまで増殖確認ができなかったウイルス RNA 低コピーの検体でも、培養上清でのウイルス RNA 増大が確認できた。また hSaV 抗原検出 ELISA の構築も検討し、陽性検体をコントロールとして 1×10<sup>5</sup>～2×10<sup>6</sup> RNA copies で良好な希釈直線性が確認でき、hSaV\_GI および GII の細胞培養上清にて高濃度のウイルス抗原を検出するに至った。

(高木研究分担報告)

### (4) 食中毒調査における遺伝子解析の現状と課題

#### ① 調理従事者および患者から検出されたノロウイルスの遺伝子解析

特に患者の所在地が他自治体のみの場

合でも、調理従事者と患者由来ウイルスの遺伝子型および塩基配列解析は感染経路解明につながる科学的根拠となった。

(入谷研究協力報告)

## ② ノロウイルスGⅡのORF2全長遺伝子解析手法に関する検討

今回確立した手法は NoV GⅡによる食中毒等の発生時に、詳細な分子疫学的解析を行う必要がある場合、有効に活用できると考えられる。

(藤井研究協力報告)

## ③ 集団胃腸炎事例から検出されたノロウイルスの分子疫学解析

同一発症者集団においては 1 塩基の置換は起こり得ることが示唆された。

(筒井研究協力報告)

## ④ 食中毒疑い事例のノロウイルス検査における検出用プライマー内配列の一致状況の解釈に関する検討

感染源等の判断の裏付けとして検出用プライマー内配列の比較結果を使用することは妥当であるが、疫学調査の結果からは感染源や感染経路の特定が難しい事例等についてはより精度の高い裏付けが必要であり、RdRp-VP1 全長配列での一致状況の確認が有用であると考えられた。

(吉澄研究協力報告)

## ⑤ ノロウイルス集団発生事例の動向と不顕性感染者の実態について

不顕性感染者の排泄するウイルスコピー数もまた、十分に感染を拡大させる量であり、集団発生等における感染源となる可能性が示唆された。

(高橋研究協力報告)

### (5) 疫学、汚染実態調査

#### ① 二枚貝のノロウイルス検出状況

河川のシジミから検出された NoV GI 群と、ヒトから検出された NoV GI 群の遺伝子型や塩基配列は異なっていたため、シジミが保有する NoV GI 群はヒトでの流行と関連性が低いと考えられる。一方、GⅡ群では、河川のシジミから GⅡ.2, GⅡ.3, GⅡ.4 及び GⅡ.17 が検出され、近年のヒトにおける流行遺伝子型を反映する結果が得られた。また、河川のシジミから検出された NoV GI 群と GⅡ群の比率は 58.3 : 41.7 と、GI 群の方がやや優勢であったのに対し、ヒトにおいては 13.5 : 86.5 と、GⅡ群が多くを占めていた。これらのことから、GI 群では不顕性感染又は、当所では把握していない GI 群患者(顕性)が発生していたことが推測される。対して GⅡ群では GI 群と比して顕性感染となる可能性が高いと考えられる。

(清水研究協力報告)

#### ② 岩ガキと生産海域における下水からのノロウイルスの検出

岩ガキと下水における NoV の汚染状況は、市中の流行と相関する可能性が示唆された。

(斎藤研究協力報告)

#### ③ 生食用カキのノロウイルス汚染調査

例年、この時期の市販生カキに NoV 汚染が認められることは多いが、今シーズンの NoV 流行状況がカキの NoV 検査結果に反映されたものと考えられた。2018 年はカキの HAV 汚染に対する懸念が大きいと考えられたが、本研究において検査に供された 2 県 3 海域のカキはすべて HAV 陰性であった。生食用カキ生産者の食中毒を防

ぐ取り組みが奏功しているのかもしれない。

(入谷研究協力報告)

#### ④ 感染性胃腸炎起因ウイルスの挙動と流行状況

流入下水中の NoV をモニタリングすることで感染性胃腸炎流行の早期察知が可能であると考えられた。一方、SaV は不顕性感染が多い可能性が示唆されることから、流入下水による流行の早期察知の指標に関してはさらなる検討が必要である。

(植木研究協力報告)

#### ⑤ 下水サンプルを用いた腸管感染ウイルスの流行解析

2017/18 シーズンは NoV による感染性胃腸炎患者や食中毒の発生の報告は少数であったが、下水中の NoV 遺伝子量は高値であった。原因は不明であるが、不顕性感染が多かった等が考えられる。サポウイルス等についても、不顕性感染等の存在が示唆された。HAV については、同系統のウイルスの地域的な流行があった可能性が考えられた。

(三好研究協力報告)

## 2. 調理従事者からの二次汚染防止に関する研究

### (1) 効率的な手洗いの方法の検討

CMC液によるコーティングを実施して水洗いする方法が、最も手に残るファージ量が少なく、トイレの前に手指にこれらのコーティング剤を塗布することで、トイレ後の手洗いにおいて、手指を汚染したウイルスを効率的に洗い流すことができると考えられた。

(田村研究協力報告)

### (2) ノロウイルスの不活化に関する研究

作用機序はウイルス粒子への直接的なものではないことが示唆された。

(小林研究協力報告)

### (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

Gdula 株と近年分離株について、3 製剤での感受性差を確認したところ、株間差が認められたが、直ちに株入れ替えの必要性は低く、RD 細胞にも十分に馴化している Gdula 株を供試することに問題はないと判断した。

(高木研究分担報告)

### (4) 加熱調理によるウイルスの不活化

CB5 について、60°C30 分、55°C60 分以上の湯煎で、3log 以上の不活化が確認できたが、50°Cでは 90 分の加熱でもウイルスの不活化には不十分であることが示唆された。また、実際の調理法（オーブン、フライパン）では、68°C5 分、65°C15 分の加熱により 75°C1 分と同等の、3log 以上の不活化が確認できた。

(野田研究分担報告)

## E. 結論

### 1. 食中毒検査体制の強化に関する研究

- 9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、食品検体を用いた際にも参加機関の評価を実施するに耐えうる統計量が得られた
- パンソルビン・トラップ法において、試薬の品質や操作ミス等による回収率低下を客観的にモニターできるように内部標準物質の導入に関して検討し、

- CA2を添加することで、回収率の評価が可能となった。
- ふき取り検体からのノロウイルス検出改良法について、Nested-リアルタイムPCR法での判定基準の策定とウイルス核酸抽出時に使用するキットの検討を行い、Nested-リアルタイムPCR法での判定は、2<sup>nd</sup> PCRのリアルタイムPCR反応サイクルを30サイクルとし、Cp値25以下で検出された検体を陽性とする事とした。また、核酸抽出キットにNucleoSpin Virusを用いることにより、遺伝子検査時のPCR反応に持ち込めるウイルスゲノム量の改善が図られた。
  - 2016および2017年度にNoV陽性となった食中毒（疑いを含む）事例の食品と拭き取り1,735検体について、nestedリアルタイムPCRを実施したところ、87検体が陽性となり、その中で41検体は通常のリアルタイムPCRでは未検出であった。食中毒調査において、原因食品および感染経路の究明のために食品や拭き取りのNoV検査を実施する際には、nestedリアルタイムPCRによる検査を実施することが望ましいと考えられた。
  - ヒトサポウイルスの培養条件を検討した結果、新たな株化細胞のうち1株で非常に良好なウイルス増殖性が認められ、これまで増殖確認ができなかったウイルスRNA低コピーの検体でも、培養上清でのウイルスRNA増大が確認できた。またhSaV抗原検出ELISA系の構築を試み、GIおよびGIIで良好な結果が得られた。
  - 感染経路究明における調理従事者由来ウイルス遺伝子解析の有用性について検討し、今回解析したすべての事例で患者由来株と遺伝子型、塩基配列が一致していたことから、患者の所在地が他自治体のみの場合でも有用であることが示された。
  - 食中毒等の発生時に詳細な分子疫学的解析を行うため、N/S領域解析よりも有用な手法として、NoV GIIの中で検出数の多い6遺伝子型（GII.2, GII.3, GII.4, GII.6, GII.14, GII.17）のORF2全長遺伝子を網羅的に増幅可能なPCR系を構築し、各遺伝子型に対応するシーケンス解析用プライマーも設計した。
  - 集団胃腸炎事例の遺伝子解析により、同一発症者集団においては1塩基の置換は起こり得ることが示唆された。
  - 食中毒疑い事例の患者、調理従事者、食品等から検出されたノロウイルス遺伝子の塩基配列の比較において、RdRp-VP1全長配列での一致状況の確認が感染源等の特定の裏付けとして有用であると考えられた。
  - ノロウイルスの集団事例において、症状の有無別で便中のノロウイルスコピー数を比較した場合、顕性感染者は不顕性感染者より有意に高いことが分かったが、不顕性感染者の排泄するウイルスコピー数もまた、十分に感染を拡大させる量であり、集団発生等における感染源となる可能性が示唆された。
  - 河川に生息するシジミについてノロウイルス（NoV）検査を行い、ヒ

トでの流行遺伝子型と比較し、関連性について調査した結果、GII群では、近年のヒトにおける流行遺伝子型を反映する結果が得られた。

- 岩ガキと下水から検出されたNoVの遺伝子型から、汚染状況は市中の流行と関連する可能性が示唆された。
- 2018年12月に市販されていた生食用カキにNoVおよびA型肝炎ウイルス汚染は認められなかった。
- 流入下水52検体を対象にNoVおよびサポウイルス (SaV) 遺伝子を定量的に検出した結果、NoV, SaVともに遺伝子は通年検出され、SaVはNoVよりも高い濃度で検出された。
- 下水サンプルを用いて腸管感染ウイルスの検出を行った結果、NoV以外にもSaV, AsV, AiV, HAVが検出されたことから、下水サンプルを用いた流行解析により、流入地域におけるウイルスの流行状況の包括的把握が可能であると考えられる。

## 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、手洗いする方法について、10人の被験者の協力のもと実際の手洗いを模して検証した結果、その有用性が示された。
- ネコカリシウイルスおよびマウスノロウイルスを用いて、天然生理活性物質235化合物について抗ノロウイルス活性の評価を行ったところ、抗ウイルス活性を示した23化合物のうち1化合物が、両ウイルスに対して活性を示した。
- ヒトノロウイルス不活性化評価にかかる代替ウイルスの候補3種類のうちコクサッキーA6型ウイルスについて、Gdula株と近年分離株間でのアルコール製剤感受性を比較し、Gdula株を選定した。
- 加熱調理によるウイルスの不活化について検討したところ、シカ肉にスパイクしたコクサッキーB5型ウイルスの湯煎による3log以上の不活化には、60°C 30分、55°C 60分以上の加熱が必要で、50°Cでは90分の加熱でも効果がないことが示された。実際の調理方法（スチームオーブン、フライパン）を用いた場合、75°C 1分、68°C 5分、65°C 15分の加熱で3log以上の不活化が確認できた。

## F. 健康危害情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 斎藤博之，野田衛：食品・臨床材料・ふき取りの前処理法，食品衛生検査指針 微生物編 改訂第2版 2018：607-618 (2018)。
- 斎藤博之：一本鎖高次構造多形(SSCP)解析法，食品衛生検査指針 微生物編 改訂第2版 2018：647-655 (2018)。
- Aksara Thongprachum, Tsuguto Fujimoto, Sayaka Takanashi, Hiroyuki Saito, Shoko Okitsu, Hiroyuki Shimizu, Pattara Khamrin, Niwat Maneekarn, Satoshi Hayakawa and Hiroshi



Ushijima. Detection of nineteen enteric viruses in raw sewage in Japan. *Infection, Genetics and Evolution*, **63**, 17-23 (2018).

- Sumie Suzuki, Takayuki Konno, Chihiro Shibata and Hiroyuki Saito. Low incidence of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* between April 2016 and March 2017 in Akita prefecture, Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.*, **71**, 477-478 (2018).
- Takayuki Konno, Shiho Takahashi, Chiharu Ogawa, Hiroko Kashio, Yuko Kumagai, Wakako Akino, Hiroyuki Saito, Kazuhito Sasaki, Yuka Kato, Youko Daimon, Mikiko Takashima and Yuto Toyoshima: Detection of multiple pathogens from a patient with traveler's diarrhea and information regarding the tests performed - Akita Prefecture. *Infectious Agents Surveillance Report*, **39** (12), 17-18 (2018).
- Konno T, Takahashi S, Ogawa C, Kashio H, Kumagai Y, Akino W, Saito H, Sasaki K, Kato Y, Daimon Y, Takashima M, Toyoshima Y, Detection of multiple pathogens from a patient with traveler's diarrhea and information regarding the tests performed - Akita Prefecture. *Infectious Agents Surveillance Report*, **39** (12), 17-18 (2018).
- 山元誠司, 江川和孝, 馬場 孝, 平

井有紀, 改田 厚, 久保英幸, 阿部仁一郎, 小笠原準, 春見 真, 藤森良子, 藤原遥香, 岡田めぐみ, 桑原靖, 村中康一: ヒトパレコウイルス 3 型が原因と考えられた感染性胃腸炎集団事例\_大阪市 2018 年, 病原微生物検出情報 月報 39, 203-204 (2018)

- van Beek J, de Graaf M, Al-Hello H, Allen DJ, Ambert-Balay K, Botteldoorn N, Brytting M, Buesa J, Cabrerizo M, Chan M, Cloak F, Di Bartolo I, Guix S, Hewitt J, Iritani N, Jin M, Johne R, Lederer I, Mans J, Martella V, Maunula L, McAllister G, Niendorf S, Niesters HG, Podkolzin AT, Poljsak-Prijatelj M, Rasmussen LD, Reuter G, Tuite G, Kroneman A, Vennema H, Koopmans MPG: Analysis of norovirus molecular surveillance data collected through the NoroNet network, 2005 - 2016, *The Lancet Infectious Diseases* **18**, 545-553 (2018)
- Takayuki Kobayashi, Hideaki Yoshitomi, Asako Nakamura, Yuki Ashizuka, Jumboku Kajiwara and Mamoru Noda: Genetic characterization of rarely reported GI.Pc\_GI.5 norovirus strain detected from a foodborne suspected outbreak in Japan., *Jpn J Infect Dis*, **71** (5) :390-392 (2018)

## 2. 学会発表

- 斎藤博之, 柴田ちひろ, 佐藤寛子, 清水博之: エンテロウイルス D68 型の乳飲みマウスでの分離例, 第 59 回日本臨床ウイルス学会, 2018, さいたま
  - Makoto Miyazaki, Hiroyuki Saito, Chihiro Shibata, Doan Hai Yen, Yujiro Arao, Naoko Iwata-Yoshikawa, Hideki Hasegawa, Hiroyuki Shimizu and Noriyo Nagata: Development of a flaccid paralysis mouse model after infection of enterovirus D68. The 20<sup>th</sup> meeting EUROPIC, Egmond aan Zee, The Netherland (2018).
  - 斎藤博之, 秋野和華子, 野田衛, 上間匡: パンソルビンの再固定によるノロウイルスの回収率向上, 第 39 回日本食品微生物学会学術総会, 2018, 大阪
  - 秋野和華子, 斎藤博之, 野田衛, 上間匡: 市販アサリからのノロウイルス検出状況, 第 39 回日本食品微生物学会学術総会, 2018, 大阪
  - 斎藤博之, 原田誠也: 「下痢症ウイルスの効率的スクリーニング」核酸処理, 検出一体型病原因子検出システム-FilmArray, 第 30 回ウイルス性下痢症研究会学術集会, 2018, 京都
  - Hiroyuki Saito, Wakako Akino, Hiroko Sato, Youko Fujiya, Chihiro Shibata, Ryoetsu Sato and Hiroyuki Shimizu: Isolation of enterovirus D68 using suckling mice and the background. 第 66 回日本ウイルス学会学術集会, 2018, 京都
  - 斎藤博之, 秋野和華子, 佐藤寛子, 藤谷陽子, 柴田ちひろ, 清水博之: 乳飲みマウスによるエンテロウイルス D68 型の分離, 第 32 回秋田応用生命科学研究会講演会, 2018, 秋田
  - 斎藤博之, 秋野和華子, 佐藤寛子, 清水優子, 早川智, 牛島廣治, 野田衛, 上間匡: 生カキ喫食後の胃腸炎症例から得られたノロウイルス感染の特徴, 第 114 回日本食品衛生学会学術講演会, 2018, 広島
  - 高木弘隆, 永田文宏, 野田衛, 上間匡: 食品媒介性ウイルス及び介在性ウイルスに関する不活性化評価手法の策定に向けた検討(2) 一代替ウイルス選定及び試験系に関する検討, 第 39 回日本食品微生物学会学術集会 2018 年 9 月, 大阪
  - 高木弘隆: 今だからこそそのウイルス細胞培養; 株化培養細胞活用術について ウイルス性下痢症研究会 第 30 回学術集会 2018 年 10 月, 京都
  - 永田 文宏, 上間 匡: 低温加熱によるシカ肉中のウイルス感染価の変化, 第 114 回日本食品衛生学会学術講演会, 2018 年, 広島
  - 田村務, 新井礼子, 広川智香, 渡部香, 西田晶子, 林真由美, 野田衛, 上間匡: 水溶性高分子ポリマーコーティングによる手指汚染の水洗いによる簡易除去, 第 39 回日本食品微生物学会学術総会, 2018 年 9 月, 大阪
- 3. 業界関係者向け説明会**
- ノロウイルス胃腸炎と感染予防対策」平成 30 年度ノロウイルス講演会, 2018 年 11 月 14 日 (水), サンクス

エア堺サンクスエアホール，合計約  
190名，公益社団法人大阪食品衛生  
協会，講師（入谷展弘）

- 「ノロウイルス胃腸炎と感染予防対  
策」平成30年度ノロウイルス講演会，  
2018年11月22日（木），大阪ガス（株）  
ハグミュージアムハグホール，合計  
約170名，公益社団法人大阪食品衛  
生協会，講師（入谷展弘）

#### 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

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 30 年度 研究分担報告書

高木 弘隆  
斎藤 博之  
渡辺 卓穂  
野田 衛  
上間 匡

平成 31 (2019) 年 3 月

平成 30 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」  
研究分担報告

ウイルス不活性化評価ガイドライン策定にむけた  
ヒトノロウイルス(hNoV)代替法の検討Ⅲ

研究分担者	高木 弘隆	国立感染症研究所
研究協力者	斎藤 博之	秋田県健康環境センター
	上間 匡	国立医薬品食品衛生研究所

### 研究要旨

ヒトノロウイルス代替ウイルスの選定において、Coxsackievirus type A6 を導入し、基本 4 製剤に加え、有機酸 2 種と市販アルコール製剤 5 種に対する感受性を検証し、市販アルコール製剤 2 種を除き、感受性は認められなかった。また Gdula 株と近年分離株について、3 製剤での感受性差を確認したところ、株間差が認められたが、直ちに株入れ替えの必要性は低く、RD 細胞にも十分に馴化している Gdula 株を供試することに問題はないと判断した。

#### A. 研究目的

冬季のノロウイルス流行に伴う食中毒等を制御すべく、その不活性化評価に関するガイドライン策定を目指し、前年度では基本 4 化学製剤へ感受性を検討し、代替候補として、Feline calicivirus(FCV)-F9、FCV-ym3 及び Coxsackievirus(Cox) type A6 の 3 種類を最終候補とした。今年度は、特に Cox-A6 について有機酸や市販エタノール製剤に対する感受性確認、また分離年の古い Gdula 株と近年分離株(2015-2017 年)との基本製剤との感受性比較を検討した。

#### B. 研究方法

##### 1. 材料

##### a) ウイルス

##### Human coxsackievirus type A6(Cox-A6)

##### ①Gdula 株 ATCC VR-1801

※ウイルス二部・清水先生より供与

##### ②2015-2017 年 マウス分離株 各 2 株

・ Akita/150389/2015 ・ Akita/150436/2015

・ Akita/160721/2016 ・ Akita/160749/2016

・ Akita/170479/2017 ・ Akita/170540/2017

※※秋田県保健環境センターより国立医薬品食品衛生研究所へ分与されたものを、共同研究先共用として再分与された。

##### b) 使用培養細胞

RD-A 細胞 (ウイルス 2 部より供与)

##### c) 使用培地

①2~5%FBS\_DMEM(high-glucose)

d)使用薬剤

- ①次亜塩素酸ナトリウム：NaClO  
(KAO 原液有効塩素 5%)
- ②エタノール(和光純薬)
- ③炭酸ナトリウム：Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(和光純薬)
- ④リンゴ酸 (和光純薬)
- ⑤クエン酸 (和光純薬)
- ⑥市販アルコール製剤 5種

※ウイルス或いはノンエンベロープウイルスに効果があると記載されているものを選定。

①~⑤については滅菌精製水にて適宜希釈し、場合によってはφ0.2μm フィルターにてろ過滅菌を行った。⑥については原液のまま使用した。

e)中和用培地：

- ①ClO 用：20mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 含有 DMEM
- ②炭酸 Na 用：重炭酸 Na 不含、10mM HEPES 含有 DMEM
- ③有機酸・アルコール製剤用  
0.5%重炭酸 Na 含有 DMEM

※エタノール製剤については中和後に SM-2 beads による処理も行った。

2. 方法1 クエン酸・リンゴ酸による

Cox-A6 Gdula 株の感受性検討

各クエン酸を 0.35M に調製し濾過滅菌したものを供試した。

各有機酸液:ウイルス液の混合比を 4:1 とし、マイクロチューブ内にて混合・反応を開始した。反応後 1~30 分まで経時的に採取し、ただちに各培地にて 7 倍希釈し反応を停止(これを 7<sup>-1</sup>と)する。

希釈用 96well-microplate にて 7 倍段階希釈系(7<sup>-2</sup>~7<sup>-8</sup>)を作成し、これを予め用意し

た培養細胞 96well-microplate に 50μl/well で接種した。36°C・5%CO<sub>2</sub>にて 6-10 日間培養後、10%ホルマリン-PBS(-)で一晩固定し、固定液を捨て methylene-blue にて染色後に CPE 観察により感染価を算出 (Behrens-karber 法)した。

方法2 市販アルコール製剤による

Cox-A6 Gdula 株の感受性検討

各エタノール製剤:ウイルス液の混合比を 9:1 とし、マイクロチューブ内にて混合・反応を開始した。反応後 20 秒~5 分まで経時的に採取し、ただちに各培地にて 7 倍希釈し反応を停止(これを 7<sup>-1</sup>と)する。またこの停止後の液を SM-2beads 100 μl bed-volume に加え、界面活性剤などの吸着除去を実施した。方法 1 と同様に希釈し、培養細胞 96well-microplate に 50 μl/well で接種、6-10 日間培養後に固定・染色を行い、感染価測定を行った。

方法3 近年分離 Cox-A6 による化学製剤感受性の検討

分与されたマウス分離株を RD-A 細胞に接種し、到達感染力価が高く、細胞変性効果の明瞭なもの 3 株 (150436、160721、170479、以降 Akita2/2015、3/2016、5/2017 とする)を供試した。次亜塩素酸ナトリウム(100・200ppm)、エタノールおよび炭酸ナトリウム(1%)については、各々昨年度の報告にある既法に従い、試験を実施した。

(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

### 結果 1 クエン酸・リンゴ酸による Cox-A6 Gdula 株の感受性検討

クエン酸・リンゴ酸に対する感受性について、Cox-A6 の反応 30 分まで経時的感染価減衰を確認したところ、減衰はほとんど認められなかった(図 1)。

### 結果 2 市販アルコール製剤に対する Cox-A6 Gdula 株の感受性検討

全 5 種 (指定医薬部外品 3、第 2 類医薬品 1、雑品 1)の市販アルコール製剤に対する感受性について、Cox-A6 の経時的感染価減衰を確認したところ、指定医薬部外品 2 種において反応 120 秒後で  $4\log_{10}\text{TCID}_{50}$  以上の感染価減衰が認められたが、他の 3 種については減衰はほとんどみられなかった(図 2 及び 3、A~E が各製品)。また概ね製剤は pH3-5 と酸性を示していた。

### 結果 3 近年分離 Cox-A6 による 3 製剤感受性検討

80%エタノールについて、Akita2/2015、Akita3/2016 では反応 5 分後までの感染価減衰は認められず、Akita6/2017 でのみ反応 5 分後で約  $2\log_{10}\text{TCID}_{50}$  の減衰が確認された(図 4)。

次亜塩素酸ナトリウムについては Akita2/2015 と Akita2016 を用いて検討したところ、両者とも有効塩素 100ppm では反応 5 分後でも感染価減衰はほとんど認められなかったが、有効塩素 200ppm では反応 60 秒以内に  $4\log_{10}\text{TCID}_{50}$  以上の感染価減衰が認められた(図 5)。この感受性パ

ターンは Gdula 株と同様であった。

炭酸ナトリウム ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )1% 液では Akita3/2016 において Gdula 株と同様、反応 40 分以降で  $4\log_{10}\text{TCID}_{50}$  以上の感染価減衰が認められたが、Akita2/2015 及び Akita5/2017 では抵抗性がみられ、特に Akita5/2017 では顕著で反応 60 分後でも約  $2.5\log_{10}\text{TCID}_{50}$  の減衰に留まった(図 6)。

## D. 考察

今回はまず市販製剤組成を想定して、Cox-A6 に対する①代表的な有機酸の感受性および②市販アルコール製剤の感受性について検証を行ったところ、有機酸に対してはほとんど感受性を示さず、これは以前に検証した Murine norovirus(MNV) のデータを補完できることが確認された。またこのような有機酸を含有するような製品も含めた市販アルコール製剤への感受性については一部の製剤についてのみ感受性が認められたものの、本来アルコール製剤に求められる即時の実効性を鑑みると、非常に低いものとなった。加えて感受性の認められた製剤は他のエンテロウイルス(Human Parechovirus type III)での感受性はほとんど認められず(データは示さず)、対 Capsid virus 効果は万能ではないことも示された。

次に Cox-A6 について近年分離株での薬剤感受性比較を検証したが、結論的には株間での感受性差は否めない、ということになった。今回実施した 3 薬剤のうち、NaClO では Gdula 株と近年分離株での感受性差はほとんど認められなかったが、エタノールでの感受性亢進(Akita5/2017)、 $\text{Na}_2\text{CO}_3$  での抵抗性亢進(Akita2/

2015、Akita5/2017)は継続して注視してゆくことが望ましく、場合によっては Gdula 株の補完を促すこともあり得るだろう。今回の代替株の選定において、市販 RD 細胞にも充分馴化されている Gdula 株を供試することに問題はないと考える。

## E. 結論

Cox-A6 Gdula 株について、クエン酸・リンゴ酸に対する感受性を検証したところ、ほとんど認められなかった。また市販アルコール製剤 5 種に対する感受性検討ではうち 2 種で感受性は認められたものの実効性としては低かった。そして 2015-2017 での Cox-A6 近年分離株について、NaClO(100・200ppm)、エタノール(80%)、Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(1%)に対する感受性を確認したところ、株間での感受性差が認められた。しかしながら Gdula 株との入れ替えの必要性は低く、継続して注視してゆくものの、代替ウイルスとしては問題ないと判断した。

## F. 研究発表

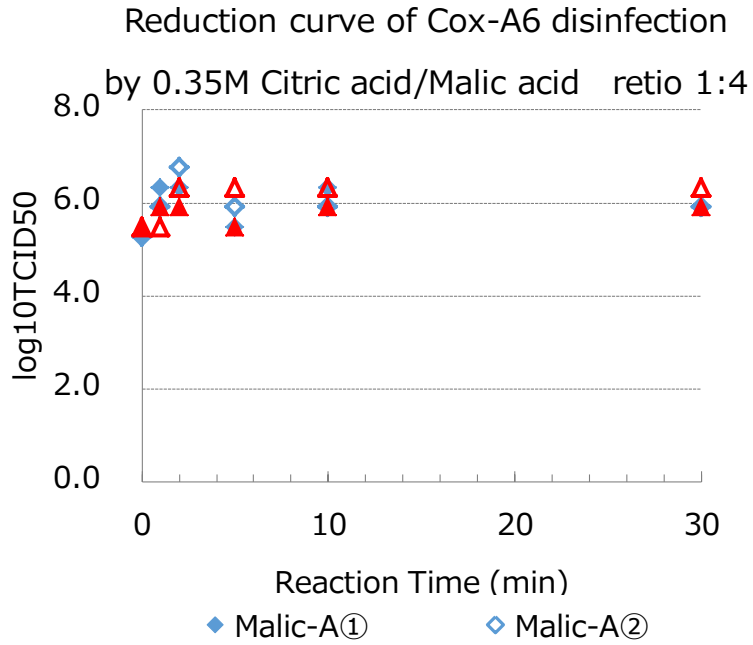
1. 論文発表 なし
2. 学会発表
  - ・食品媒介性ウイルス及び介在性ウイルスに関する不活性化評価手法の策定に向けた検討(2)ー代替ウイルス選定及び試験系に関する検討 第39回日本食品微生物学会学術集会 2018年9月 大阪

## 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



☒ 1.



☒ 2.

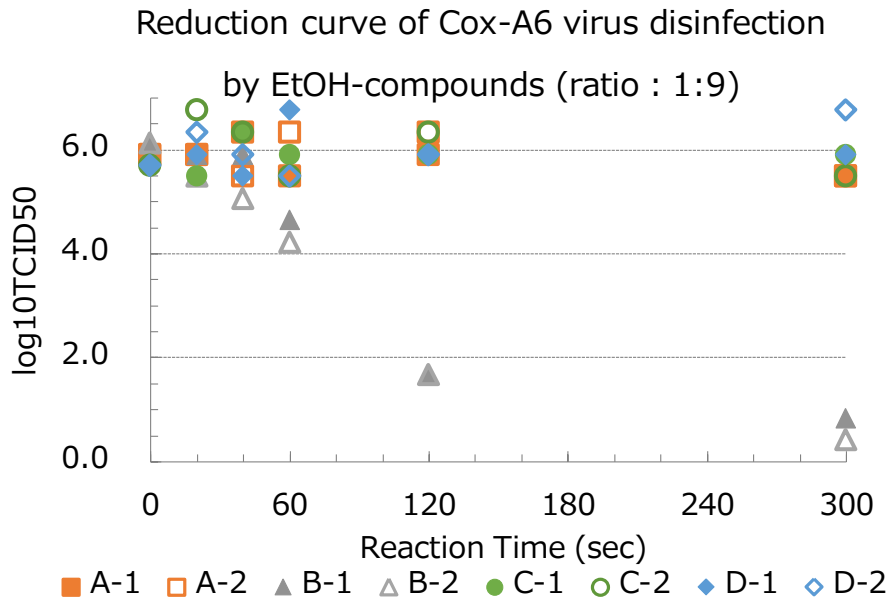


図 3.

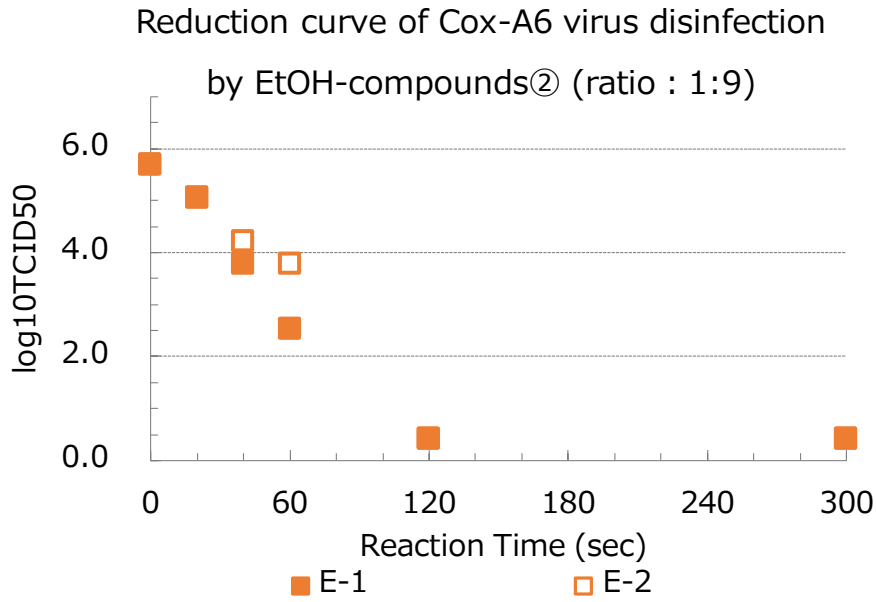


図 4.

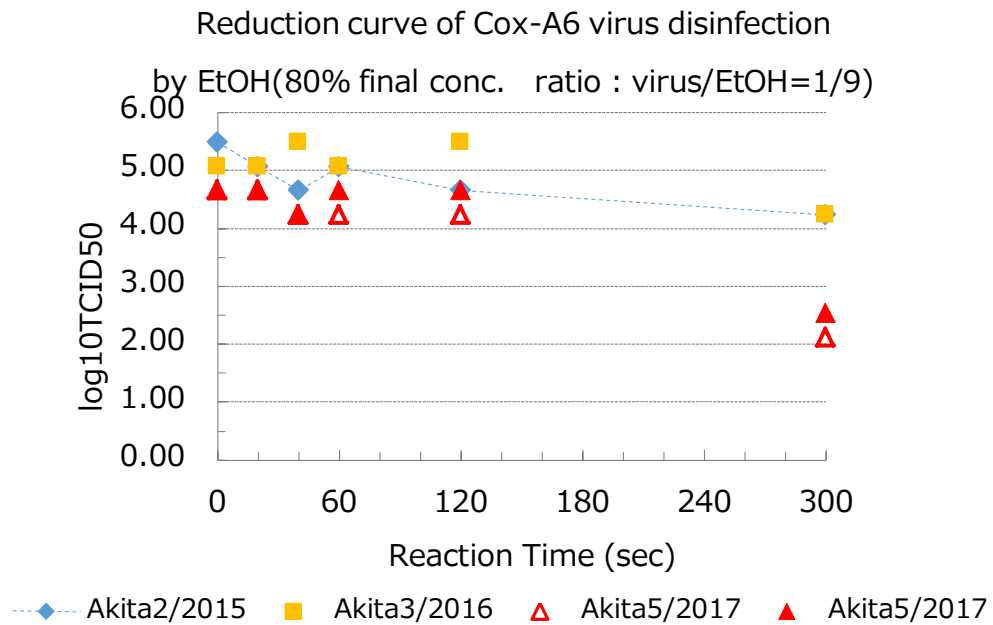


図 5.

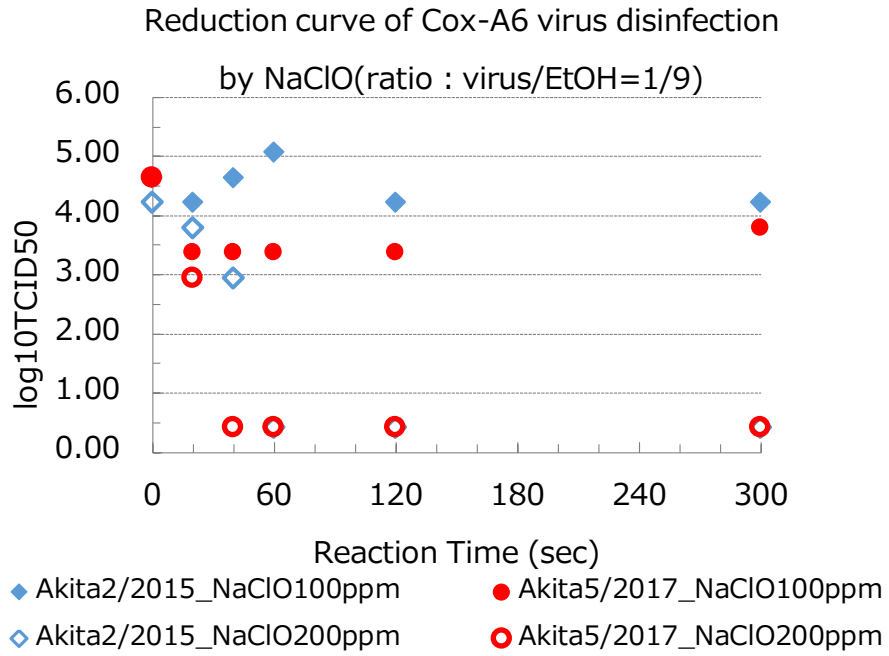
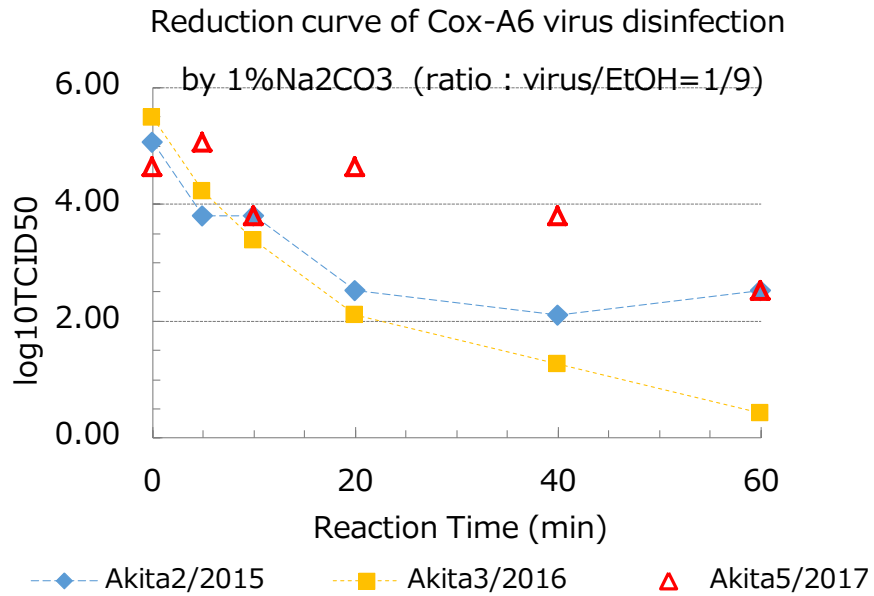


図 6.



平成 30 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」  
研究分担報告

代替ウイルスを用いないウイルス不活性化評価  
ヒトサポ／ノロウイルス培養系開発の試み II

研究分担者	高木 弘隆	国立感染症研究所
研究分担者	野田 衛	国立医薬品食品衛生研究所
研究協力者	斎藤 博之	秋田県健康環境センター
	小林 孝行	福岡県保健環境研究所
	高橋 知子	岩手県環境保健研究センター
	岡 智一郎	国立感染症研究所

### 研究要旨

昨年度に続き、新たな株化細胞を用いてヒトサポウイルスの培養条件を検討した。その内の 1 つで昨年度の細胞株に比べ、増殖性・継続培養期間延長が確認され、到達ウイルス量は  $10^5 \sim 10^6$  copies/ $10 \mu\text{l}$  culture-sup であった。また hSaV-VLP を抗原として作製された抗血清による Ag 検出 ELISA 系の構築を試み、GI および GIV で良好な ELISA が組み上げられた。また GI 及び GII(系は継続検討中)で、前述の培養上清より高濃度のウイルス抗原を検出するに至った。今後感染力価測定やウイルスパネル作製に高い可能性が見出せた。

#### A. 研究目的

本研究班におけるサブテーマとして、昨年度より稼動したヒトサポ／ノロウイルスの培養系の検討であるが、昨年はヒト由来株化細胞とコール酸類の組合せによるいくつかの培養上清から、サポウイルス RNA シグナルの経時的増大が確認された。

今年度は数種の株化細胞とサプリメントを検討したところ、更にサポウイルス増殖の高効率な系を見出した。この新たな系により RNA-低コピーの陽性検体からもウイルス RNA シグナルの増大が確

認されたので、報告する。

#### B. 研究方法

##### 1. 材料

##### a) ウイルス陽性検体

- ・患者由来サポウイルス陽性材料 (処理済み) : 秋田-20 検体、福岡-7 検体 岩手-3 検体

##### b) 使用培養細胞

- ・培養細胞 : ヒト由来培養細胞 4 種類 (A-D とする)  
※昨年度報告済みのものも含める。

##### c) 細胞用培地 :

クラシカル培地等より各々の細胞について自家変法調製したものをを用いた。

d) サプリメント：

コール酸を含め 7-8 種類を各培養細胞に合わせて調製した。

e) その他

・ RNA 抽出及び RT-PCR に関する試薬、primer 等については昨年度報告書と同様とした。

・ 抗 hSaV-ウサギ血清

抗 hSaV-モルモット血清

ウイルス 2 部より分与、genotype 別 VLP により作製されたもの<sup>文献</sup>。

2. 方法 1 新規候補細胞株への陽性検体接種および hSaV 増殖検討

新規細胞株について長期培養が可能な培地組成を検証し、加えて各サプリメントの細胞毒性試験による適正添加量を決めた。これらを踏まえ、12 ないし 24well-plate に各細胞を準備し、陽性検体を一定量接種・接触・洗浄後、一定期間培養し、培養上清中のウイルス RNA 検出及び定量を行った。

方法 2 hSaV 抗血清による抗原検出

ELISA 構築と培養上清中の抗原検出の試み

RNA 定量済み陽性検体を control として、抗血清の組合せ、固相及び sandwich 抗血清濃度を決定し、マイクロプレート ELISA による培養上清中の抗原検出を試みた。なお検出系には HRP-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-TMB を使用し、主波長 450nm/副波長 750nm での吸高度(ABS)測定を行った。

(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、また検体はすべてコード化され、個人情報との連結は絶たれている。同時に今回年齢・性別・地域といった個人特定につながる情報は一切必要としていない。

C. 研究結果

結果 1 新規細胞株での hSaV の増殖性に関する検討

新規細胞株のうち、特に 2 種類の細胞株において、前年度のものと比較して、より強いウイルス RNA シグナルが確認された。定量の結果 10<sup>5</sup>~10<sup>6</sup> copies/10 $\mu$ l 培養上清となり、昨年よりも約 100 倍高くなった(図 1)。

また昨年度増幅が確認できなかった 10<sup>4</sup> copies/10 $\mu$ l レベルの検体についても秋田・福岡由来両者において培養上清からのシグナル検出に至った(図 2-①、-②)。培養期間も昨年度の場合 7 日間が限界であった培養期間が新規細胞では 10 日以上継続が可能となった。

結果 2 hSaV-Ag 検出 ELISA 構築の検討と培養上清からの Ag 検出

文献より hSaV 株 Mc114(GI.1)、Syd3・SW278(GII.3)、Syd53・C12(GIV.1)といった計 5 種類の VLP で免疫されたウサギ抗血清およびモルモット抗血清にて、陽性検体を control として抗原希釈直線性を確認したところ、Mc114-GI.1 及び Syd53-GIV.1 で良好な希釈直線を得られることが示された(図 3-①、-②)。GII.3 については現在

検証中であるが、Syd3 で反応性の良いことが示唆されている。

また当該 Ag 検出 ELISA により今回検討した新規細胞を用いて調製した hSaV-GI.1 及び GII.3 の培養上清から高濃度の各抗原(2 倍希釈で ABS 0.8 以上)が検出された。

#### D. 考察

今回の検討で用いた新規細胞株のうち良好な結果を得た細胞株(細胞 B とする)については、当所細胞バンク推奨培地では 4-5 日の継続培養が限界であったが、培地処方を変更することで 10 日以上(最長 14 日)継続培養が可能となった。加えて hSaV-GI 及び GII の増殖効率が前年のものよりも高く、この培養期間延長と増殖効率改善により、前年まで増殖が確認できなかった福岡由来の陽性検体からもウイルス RNA のシグナル増大が確認できた。現在検討継続中であるが、ウイルス増殖は 10 日前後が最大となることが示唆されており、T25 フラスコでの hSaV\_GII.3-RNA は約  $1.1 \times 10^9$  copies/flask に達することが確認されている。また後述する Ag 検出 ELISA でも培養上清中抗原を捉えることができていることから、前年報告のような virion への有機物修飾のような事象は可能性が低いと考える。なお hSaV-GIV および GV のウイルス増殖条件についてはサプリメントも含め、継続検討中である。

Ag 検出 ELISA では抗血清作製用 VLP 抗原の違いにより、実際の陽性検体と全く反応しない抗血清 (GVI-C12 株抗血清) が確認され、今後抗血清を作製する上で

注目すべき点と考える。今回陽性検体を control として、その希釈直線性を検証したところ、概ね  $1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$  copies までは良好な直線性が認められた(ABS 上限は概ね 0.5-0.6)ので、今後はこの系による感染力価算出を目指し、加えて RNA コピー数との相関や ELISA による力価推定といった手法も確立してゆきたい(現在岩手由来検体を用いて検討中)。

そして今回見出した培養手法により一部では継代培養の可能性も確認できており、これまで不可能であった環境における感染性の保持力(環境耐性)や食品への添加回収試験を実施するための、ウイルスパネル・プール作製に向けて、さらに検証を続けてゆく。

#### E. 結論

ヒトサポウイルスの培養検討において新規株化細胞を用いたところ、細胞 B において、非常に良好なウイルス増殖性が認められ、これまで増殖確認ができなかったウイルス RNA 低コピーの検体でも、培養上清でのウイルス RNA 増大が確認できた。また hSaV 抗原検出 ELISA の構築も検討し、陽性検体をコントロールとして  $1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$  RNA copies で良好な希釈直線性が確認でき、hSaV\_GI および GII の細胞培養上清にて高濃度のウイルス抗原を検出するに至った。

参考文献>>

Grant S. Hansman, et al, EID vol.13, NO.10, Oct 2007, p1519-1525

#### F. 研究発表

1. 論文発表 なし

2. 学会発表

高木 弘隆 今だからこそそのウイルス  
細胞培養；株化培養細胞活用術について  
ウイルス性下痢症研究会 第 30 回学術集  
会 2018 年 10 月 京都

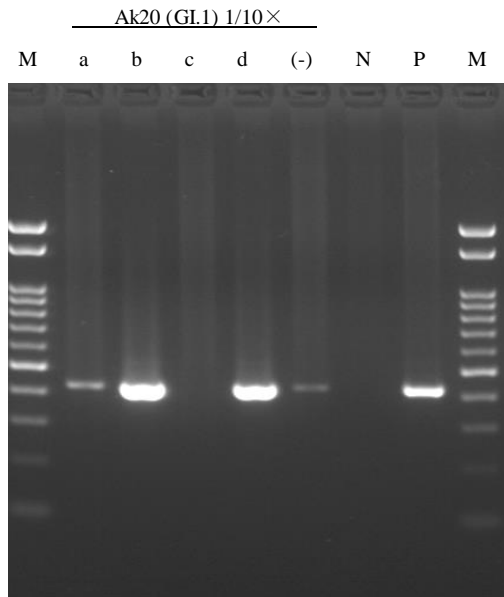
**G. 知的財産権の出願・登録状況**

1. 特許取得：なし

2. 実用新案登録：なし

3. その他：なし

図 1. 新規細胞株 B による hSaV 増殖性検討

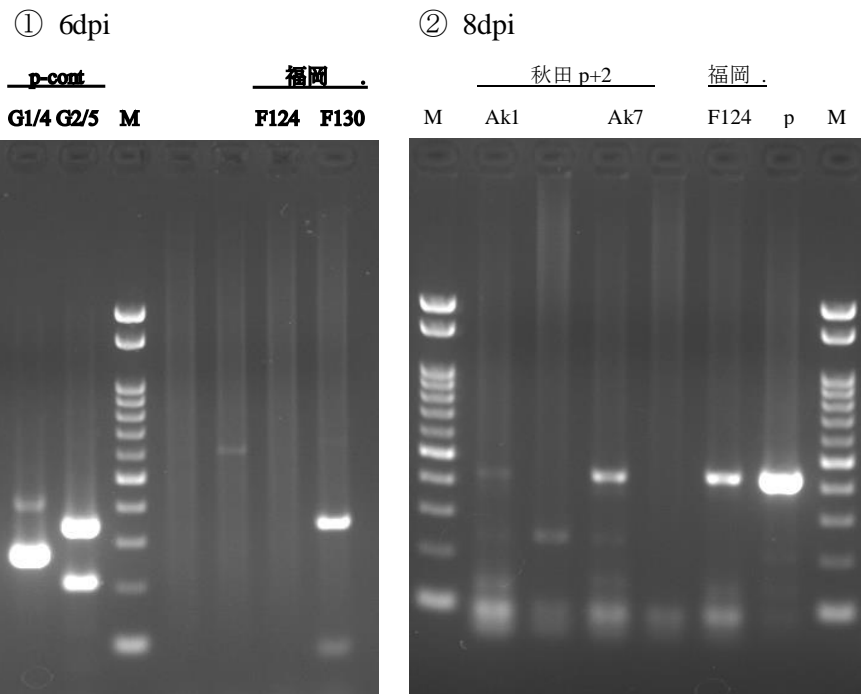


秋田由来検体 Akita20(Ak20:GI.1)を 10 希釈( $6.9 \times 10^6$  copies/ $10 \mu$ l)して各 well に接種、既法に従い吸着後に洗浄・培地交換を行い、6.5 日培養。上清を回収し、RNA 検出と定量を行った。  
☆a~d はサプリメント、(-)はサブリ無添加

定量結果：

- ・ サプリ b :  $1.34 \times 10^6$  copies/ $10 \mu$ l
- ・ サプリ d :  $2.34 \times 10^5$  copies/ $10 \mu$ l

図 2. 新規細胞株 B による低 RNA コピー-hSaV サンプルの増殖 trial

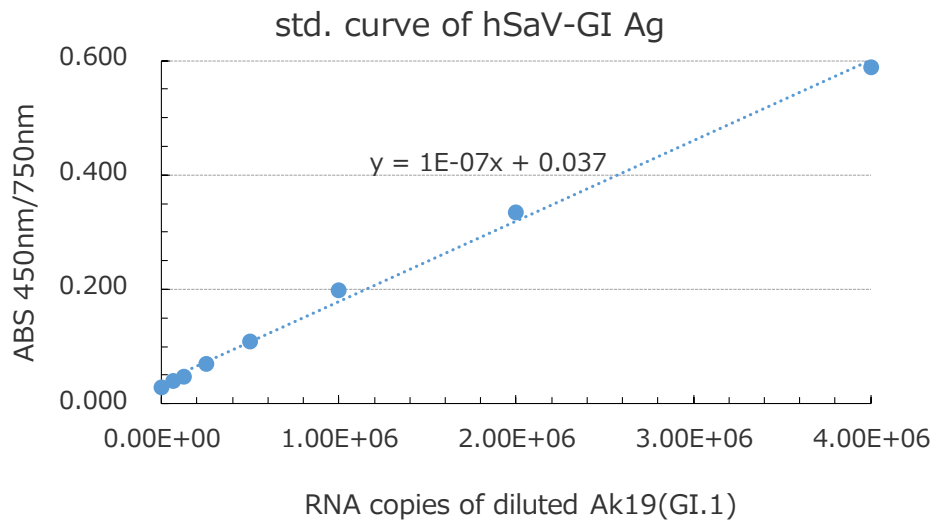


F124(GI.2) :  $3.4 \times 10^5$  copies/well、F130(GII.3) :  $5 \times 10^4$  copies/well で接種。各々の培養上清では、 $2.8 \times 10^3$ 、 $2.2 \times 10^4/100 \mu$ l となった。

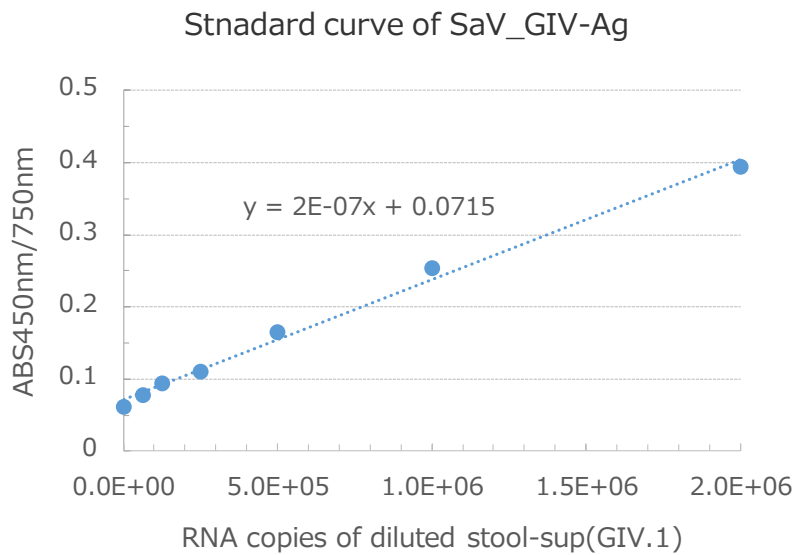


図 3.Ag 検出 ELISA での希釈直線性

①hSaV\_GI.1 陽性検体



②hSaV\_GIV 陽性検体



平成 30 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」  
研究分担報告

パンソルビン・トラップ法の実用面における課題への対応

研究分担者	斎藤博之	秋田県健康環境センター・保健衛生部
研究協力者	秋野和華子	秋田県健康環境センター・保健衛生部
研究協力者	佐藤寛子	秋田県健康環境センター・保健衛生部
研究協力者	清水優子	日本大学・医学部・微生物学教室
研究協力者	牛島廣治	日本大学・医学部・微生物学教室

研究要旨

食中毒対策の一環として、どのような食品に対してもウイルス検査ができるパンソルビン・トラップ法の開発を進めている。平成 28 年度はこれまでに流行のなかった型であるノロウイルス(NoV) GII.17 の出現を受けて、本法の有効性の確認を行った。平成 29 年度は本法の根幹をなす試薬であるパンソルビン(ホルマリン固定黄色ブドウ球菌)の品質に関する問題(固定不十分)への対応を行った。平成 30 年度は実用上で発生しうる様々なトラブル(試薬類の品質や操作ミス等)を客観的にモニターするため、内部標準物質の導入について検討した。

これまで何度も流行を繰り返しているノロウイルス GII.4 に感染した際に、GII.17 等の他の型に対する抗体も同時に誘導されてくることを見出し、ガンマグロブリンの有用性について再評価を行った。ガンマグロブリンを用いて NoV GII.17 の回収を試みたところ、nested real-time PCR を用いることで、ポテトサラダと焼きそばにおいて、35 コピー/g まで検出可能であった。

パンソルビンの品質に関する対応として、再固定プロトコルを考案した。再固定を行うことで、問題発生前に購入したパンソルビンと同等以上の回収率が得られるようになった。

CA2 を内部標準物質として添加し、検査対象である NoV と同時に回収・定量したところ NoV と CA2 の回収率比は食品の種類に関わらず 2~3 倍であった。このことから、食中毒事例で搬入された食品検体に CA2 を一定量添加し、その回収率を評価することで、検査精度を担保(「陰性」は本当に陰性である)等)することが可能となった。

A. 研究目的

ウイルス性食中毒の対策として二枚貝の汚

染実態調査や、調理従事者への衛生教育等が進められてきている。しかしながら、原

因として疑われる食品からのウイルス検出は、その作業の困難さからこれまでほとんど検討されてこなかったため、具体的な汚染ルートの解明に決め手を欠いていた。原因物質としてはノロウイルス(NoV)が大部分を占めているが、他にもサポウイルスやアデノウイルス 41 型に代表される腸管系アデノウイルスも含まれている。さらに、近年では A 型肝炎ウイルスによる事例が急増し、野生動物に由来する E 型肝炎ウイルスの感染報告も右肩上がりの傾向を示している。こうした状況から食品中のウイルスを検出する方法の確立・普及が急務となっている。平成 19~21 年度に実施された厚生労働科学研究費補助金「食品中のウイルスの制御に関する研究」(H19-食品-一般-016)において、固形、液状、練り物、油物などの一般的な食品から NoV を検出する手法としてパンソルビン・トラップ法(パントラ法)を開発し、この問題を解決するための糸口を見出すことができた。その後、平成 22~24 年度に実施された厚生労働科学研究費補助金「食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究」(H22-食品-一般-013)において、市販のガンマグロブリン製剤を利用することで添加抗体の安定供給が図られた他、検出した遺伝子の塩基配列解析も可能な方法として発展させることができた。一方、次のような実用面で解決すべき課題も見つかった。

①平成 26~27 年にかけて、これまでに流行の見られなかった遺伝子型である NoV GII.P17-GII.17(以降、GII.17 と表記)による食中毒事例が多発した。ガンマグロブリン製剤は過去の流行に由来する様々な抗体の集積であると考えられるならば、捕捉抗体としての有効性を再検討しなければならない。

②本法の普及と合わせてパンソルビンの生産ラインが急拡大したこともあり、近年になってホルマリン固定の程度の弱い製品が販売されていることが判明したため、その対応策が必要となった。

③試薬の品質や操作ミス等による回収率低下を客観的にモニターできるように内部標準物質の導入に関して検討する必要が生じた。

研究のスケジュールとしては、平成 28 年度に課題①を、平成 27 年度に課題②を、平成 30 年度に課題③を解決するための検討を行った。

## B. 研究方法

### 1. 研究材料

食品検体として、市販されているポテトサラダ、焼きそば及びヒジキの煮つけを用いた。また、検出対象となるウイルスとして、NoV GII.4 (AB293424)、及び NoV GII.17 (2016 年 1 月 28 日、感染症発生動向調査にて採取)を含む糞便を用いた。

血清中の IgG の推移を検討するため、感染年月日の明らかな患者の保存血清を、本人の同意の元に使用した。

内部標準物質として、感染症発生動向調査で得られた咽頭拭い液から乳飲みマウスを用いて分離した A 群コクサッキーウイルス 2 型(CA2)、CA6、CA16、及び国立感染症研究所から配布されたエコーウイルス 9 型(Echo-9 Hill 株)を用いた。

### 2. 試薬類

#### 1) 食品洗滌液

Tris-HCl (pH8.4) – 0.5M NaCl – 0.1% Tween20 を調製して使用した。

#### 2) 5%ガンマグロブリン製剤

- 米国 HDM Labs Inc 社の試薬用 5%ガンマグロブリン製剤を用いた。Advy Japan 社から購入した。
- 3) パンソルビン(ホルマリン固定黄色ブドウ球菌)  
市場供給されているパンソルビン(メルク社)を検討するに当たり、2014 年購入品(ロット No.: D00160008)、2015 年購入品(ロット No.: D00173442)、2016 年購入品(ロット No.: 2706036)、2017 年購入品(ロット No.: 2799115)を用いた。
- 4) フェノール系 RNA 抽出キット  
TRIzol-LS (Thermo Fischer Scientific) を使用した。
- 5) カラム方式の RNA 抽出キット  
QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) を使用した。
- 6) 再懸濁液  
5)の抽出キット添付の AVL 液を用いた。
- 7) DNase I (RT Grade) 及び RNase inhibitor  
ニッポンジーンの製品を使用した。
- 8) アミラーゼ  
枯草菌由来  $\alpha$ -Amylase 粉末(和光純薬)を液化調製(平成 25 年度報告書参照)して使用した。
- 9) 食品処理袋  
サニスペックテストバッグ(アズワン)を使用した。
- 10) 逆転写酵素  
ReverTraAce(東洋紡)を使用した。
- 11) conventional PCR 用酵素  
1st.PCR、及び 2nd. PCR には AptaTaq Fast PCR Master(日本ジェネティクス)を用いた。このとき酵素をホットスタート化するため、anti-Taq high(東洋紡)を添加した。
- 12) 逆転写反応に用いたプライマー  
CA と Echo-9 に対しては random primer (9mer タカラバイオ)、NoV に対しては COG2R (J. Clin. Microbiol., 41, 1548-1557, 2003)、または PANR-G2 (Food Environ. Virol., 7, 239-248, 2015)を用いた。
- 13) conventional PCR に用いたプライマー  
COG2F(J. Clin. Microbiol., 41, 1548-1557, 2003) / G2SKR (J. Virol. Methods, 100, 107-114, 2002)のプライマーセットを用いた。
- 14) conventional PCR 装置  
アステック社製「PC-320」を用いた。
- 15) real-time PCR 装置  
ロシュ社製「LightCycler320S」、または「LightCycler480」を用いた。
- 16) real-time PCR 用酵素  
日本ジェネティクス社製「LightCycler480 Probes Master」を用いた。
- 17) ELISA 抗原  
NoV GI.3、GI.4、GII.3、GII.6、GII.17 で作製したウイルス様粒子 (VLP)を用いた。
- 18) 再固定処理用緩衝液  
洗浄用に PBS(-)、固定用に 1.5%ホルマリン/PBS(-)、保存用に 0.1%アジ化ナトリウム/PBS(-)を用いた。
3. パントラ法の手順  
平成 22 年度に完成した汎用プロトコル(図 1)に従った。この時、平成 25 年に検討したオンカラム DNase I 処理(図 2)を組み入れた。なお、ウイルスと抗体の反応性を確認するための試験では食品洗滌液のみであることから、超音波処理と  $\alpha$ -Amylase 処理

は省略した。

#### 4. real-time PCR 反応系

CA と Echo-9 に対しては Nijhuis らの方法 (J. Clin. Microbiol., **40**, 3666-3670, 2002)、NoV に対しては Kageyama らの方法 (J. Clin. Microbiol., **41**, 1548-1557, 2003) に従った。

#### 5. NoV GII.17 に対する有効性の検討

食品洗滌液 50mL 中に  $1.00 \times 10^4 \sim 2.01 \times 10^6$  コピーの NoV GII.17 を添加し、ガンマグロブリンを捕捉抗体としたパントラ法による回収率を検討した。また、ポテトサラダと焼きそば、それぞれ 10g を用いた添加回収試験も合わせて行った。さらに、ポテトサラダと焼きそばに様々な濃度で NoV GII.17 を添加し、COG2F / G2SKR で 1st. PCR を行った後、real-time PCR により検出できる限界について検討した。

#### 6. パンソルビンの再固定

図 3 の手順によりパンソルビンの再固定を行った。再固定したパンソルビンについて、ガンマグロブリンを捕捉抗体としたパントラ法による回収率を検討した。この際、TRIzol-LS / クロロホルム抽出後における検体の状態を観察した。

#### 7. 内部標準物質の選定、及び運用に関する検討

内部標準物質の候補として、CA2、CA6、CA16、及び Echo-9 を食品洗滌液 50mL に投入し、それらをパントラ法で回収した。抽出した RNA から random primer による逆転写反応を行った後、cDNA を DW で 10

倍希釈し、コピー数を real-time PCR にて測定した。次に、3 種類の食品を NoV GII.4 で汚染させて模擬検体を作製した。さらに内部標準物質として CA2 を添加した後、パントラ法 (再固定の有無で 2 通り) でウイルスを回収した。抽出した RNA を 2 チューブに分け一方を PANR-G2 で (NoV 用)、他方を random primer で (CA2 用) 逆転写反応を行い、得られた cDNA を DW で 10 倍希釈した後、それぞれのコピー数を real-time PCR にて測定した。

### C. 研究結果

#### 1. NoV GII.17 に対する有効性の検討

図 4 に示すとおり、GII.4 に感染した場合において、GII.3 と GII.17 の IgG の上昇が認められた。次に食品洗滌液 50mL からガンマグロブリンを用いて NoV GII.17 の回収を試みた結果を表 1 に示した。添加量が少なくなるにつれて回収率が高くなる傾向にあるのがわかる。また、実際に食品を用いて添加回収試験を行った結果については、食品洗滌液からの回収率 ( $10^5$  コピー/台) とほぼ同じであった (表 2)。さらに、図 5A、5B に示したとおり、ポテトサラダと焼きそばの両方において、nested real-time PCR を用いることで、35 コピー/g まで検出可能であった。

#### 2. パンソルビンの品質に関する対応

図 6 に示すとおり、TRIzol-LS / クロロホルム抽出後の検体の状態を比較すると、遠心直後は水層・中間層・有機層に分かれてロット差は認められなかった。しかし、水層に 0.8 倍量のエタノールを添加した段階で、2015 年以降に購入したパンソルビンでは白濁が生じた。さらに、これを遠心することで沈澱が

確認された。Real-time PCR で NoV の遺伝子を増幅したところ、2014 年に購入したパンソルビンと比較して、2015 年に購入したそれは明らかに効率が低下していた(図 7)。特にエタノール添加時の白濁を遠心除去した場合には、全く検出できなくなった。次に 2015 年購入のパンソルビンを図 3 の手順に従って再固定したところ、抽出工程における白濁が起こらなくなり(図 8)、回収率は 2014 年購入分と同等以上になった(表 3)。

### 3. 内部標準物質導入に関する検討

表 4 に示すとおり、内部標準物質の候補に挙げた 4 種類のウイルスの内、CA2 の回収率が最も高かった。このことから、以後の検討は CA2 を用いることとした。次に、NoV で汚染された食品を検査する場合を想定し、内部標準物質として CA2 を添加して、NoV と同時に回収を試みた。表 5 に示すとおりポテトサラダにおいては、NoV の回収率が 36.8%、CA2 の回収率が 16.1%であり、再固定をしないパンソルビンを用いた場合は両者ともに回収率の低下が見られた。焼きそば(表 6)とヒジキの煮つけ(表 7)においても同様の結果が得られた。表 8 に示すとおり、NoV と CA2 の回収率の比は、食品の種類にかかわらず 2~3 倍程度であった。このことは、実際の事例において搬入された食品検体に CA2 を添加して、回収率をモニターすることで、検査の工程にトラブルがないかを評価する指標として使えることを意味する。

## D. 考察

### 1. NoV GII.17 に対する有効性の検討

現在パントラ法の捕捉抗体として用いられているガンマグロブリンは、過去の流行ウイ

ルスに対する抗体(IgG)の集積であるものと考えられている。それゆえ、多くの種類のウイルスに対して汎用できることが期待されるが、NoV GII.17 のように突如として流行が拡大したウイルスに対しては、その抗体が含まれていないことが懸念された。また、将来的には同様の“新型”ウイルスに対する問題が繰り返し起こり得るものと想定される。本研究では、最初に感染者の保存血清を利用して、NoV GII.4 に感染した際の免疫応答について検討した。図 4 に示したとおり、GII.3 と GII.17 に対しても感染前後の ELISA OD 値において 2 倍以上の抗体上昇が見られる。感染日は 2012 年 12 月 4 日であるから、GII.17 の流行が拡大した 2014 年よりも 2 年前の時点になる。以上のことから、過去に何度も大規模な流行が起こった GII.4 に感染した際に、同時に GII.17 の抗体も誘導され、それはすでにガンマグロブリンにも含まれているものと推察される。

ガンマグロブリン中にすでに NoV GII.17 に対する抗体が含まれていることが期待できるため、次の段階として、パントラ法による添加回収試験を行った(表 1)。食品洗滌液 50mL 中に NoV GII.17 を  $2.01 \times 10^6$  コピー添加した際の回収率は 3.61%であったが、 $1.46 \times 10^5$  コピー添加の場合は 5.34%、 $1.00 \times 10^4$  コピー添加の場合は 10.60%と、低濃度になるにつれて回収率が上昇傾向にあることがわかる。表 2 に示した食品から回収試験( $10^5$  コピー台)においても、表 1 と同等の数値であった。参考値としてあげた GII.4 の回収率は、 $1.16 \times 10^5$  コピー添加で 25.10%と明らかに高いが、これは図 4 に示された抗体の絶対量の違いを反映しているものと考えられる。しかしながら、多くのウイ

ルス性食中毒事例は、微量のウイルスによる汚染に起因しているため、低濃度になるにつれて回収率が高くなるという結果は、ガンマグロブリンが有用であることを支持するものである。

表1において、NoV GII.17の汚染濃度が低くなるほど回収率が高くなる傾向にあることが示されたが、さらに低濃度の汚染について調べることは、リアルタイムPCRの機器表示値が10コピー/well以下になることから無理がある。そこで、低濃度領域において一般的な検出手法とされる nested real-time PCRによって検出限界を検討した。ポテトサラダと焼きそばを様々な濃度の NoV GII.17 で汚染させて、nested real-time PCRでの検出を試みた結果が図5A、5Bである。いずれの食品検体においても35コピー/gの汚染濃度まで検出できていることがわかる。35コピー/gという数値は、本法の原著(Food Environ. Virol., 7, 239-248, 2015)において、GII.4を用いて得られた成績と同等であることから、前述の低濃度汚染ほど回収率が高くなるという結果の延長と見なして差支えないものと考えられる。

## 2. パンソルビンの品質に関する対応

本法の開発がスタートしたのは2007年であり、2014年まではパンソルビンに不具合は認められなかった。しかし、2015年以降に購入したパンソルビンは、操作中に黄色ブドウ球菌(ブ菌)の成分に由来した白濁・沈澱が生じる等の問題が発生した(図6)。RNA抽出キットの説明書には、「沈澱物が生じた場合は再懸濁して操作を進める」と書かれているが、それに従ってもNoV検出系における悪影響は排除できなかった(図7)。

この問題は、本法の普及に伴って生産ラインが拡大したことと無関係ではないと推察される。一方、パンソルビンの試薬そのものは、PCR登場以前から蛋白質の免疫沈降法のために用いられており、出荷基準は試薬1mL当たりヒトIgGを2mg以上結合するというものである。従って、固定の程度が弱まり、原材料であるブ菌の核酸成分が漏出・沈澱することは想定されていない。製品としては正常である(不良品ではない)ことから、メーカー側に対応を求めることは困難である。以上のことから、この問題を解決するためには、パンソルビンを購入後にホルマリンを用いて再固定するのが現実的であると考えられた。

抽出工程において白濁が生じていたパンソルビンを再固定したところ、図8、及び表3に示したとおり、問題は解決された。また、本研究では白濁の原因が生産過程における固定不足であることを想定したが、結果としてそのことが証明されたことになる。再固定はパンソルビン購入後に1回だけ行えばよく、以後は0.1%アジ化ナトリウム添加PBS(-)に懸濁して保存しておくことで、これまでどおり使用できる。固定後10ヶ月後に使用した場合でも回収率に変化は認められなかったことから、保存性に問題はないと考えられる。再固定には高速冷却遠心機を用いるが、一般的な試験検査機関では常備されているものであり、実施における負荷は最小限に抑えられている。本法はすでに多くの機関で食中毒検査に用いられていることから、再固定マニュアルについて「食品衛生検査指針微生物編 改訂第2版 2018」に記述し、「[http://www.nihs.go.jp/fhm/csvdf/sttest/fixing\\_of\\_pansorbin.pdf](http://www.nihs.go.jp/fhm/csvdf/sttest/fixing_of_pansorbin.pdf)」よりダウンロードできるように手配した。

### 3. 内部標準物質導入に関する検討

パンソルビンの品質の問題については、再固定を行うことで解決を見たが、試薬・機器の不具合や操作ミス等でウイルスが検出されなくなることはリスク要因として残っている。また、食品の種類によっては回収そのものが困難なものが存在する可能性もある。このような理由から、実際の食中毒事例において NoV が検出されなかった場合に、本当に陰性なのか、何かのトラブルで検出できないのかを客観的にモニターするしくみが必要となった。すでに他分野で用いられている内部標準は、搬入された検体に一定量の既知の物質を添加して、本来の検査対象となる物質と同時に検出を行い、回収率を評価するというものである。パントラ法はウイルスの検出法であるため、内部標準物質としても既知のウイルスを用いるのが妥当と考えられる。

パントラ法の基本原理は、食品乳剤中のウイルス粒子に抗体を結合させ、その複合体をブ菌表面に発現している Protein A に吸着させることで、菌体とともにウイルスを回収することである。捕捉抗体の供給源として、多種多様な抗体が含まれているガンマグロブリンが使用される。従って、内部標準物質としての第一の条件は、その抗体がガンマグロブリンに含まれていることである。第二の条件は、内部標準物質を定量的に検出するための real-time PCR による測定系が確立されていることである。第三に、食中毒の原因になりにくい(これまで報告がない)物質でなければならない。第四に、容易に入手可能な物質である必要がある。これらの条件を満たす内部標準物質として、ほとんどの人が感

染するヘルパンギーナや手足口病の病原体である CA を候補とした。Real-time PCR による測定系が確立しており、これまでに CA を原因とした食中毒事例は報告されていない。また、感染症発生動向調査の検体から分離培養できることに加えて、感染症法に定められた特定病原体に該当しないため、機関間での分与も容易である。実際に 3 種類の CA と、これまで PCR の内部標準物質として使われていた(パントラ法とは無関係) Echo-9 について、ガンマグロブリンを用いたパントラ法による回収率を比較したところ CA2 が最も高い結果となった(表 4)。このことから、今回比較した内部標準物質の候補の中では、CA2 が適しているものと考えられた。

次に、食中毒事例において食品検体が搬入された状況を想定し、あらかじめ NoV で汚染させた模擬検体に、内部標準物質である CA2 を添加し、それらを同時に検出できるかどうかを確認した(表 5~7)。この時、再固定をしない(品質に問題のある)パンソルビンを用いた場合を比較対象とした。再固定をしないパンソルビンを用いた場合は、当然のごとく NoV の回収率は低下するが、実際の事例ではそのことを評価することは困難である。そこであらかじめ CA2 を添加しておき、その回収率をモニターすることでパントラ法がうまく機能しているかを評価することが可能となった。また、これまでに回収率が低めに出る食品としてヒジキが指摘されていたが(原因は不明)、そうした食品による差異についても評価できるようになった。回収率の評価基準については、第 5 回国際カリシウイルス会議(2013, 北京)において、<0.1% : very low、0.1~1%: low、1~10%: moderate、



10～70%: high、70%<: very high とする例が示されているので、現時点ではこれを準用することもできるであろう。表 8 に示されたとおり、NoV と CA2 の回収率比は、食品の種類に関わらず 2～3 倍弱であることから、運用においては CA2 の回収率を評価した後、その 2～3 倍が NoV の回収率であると見積もることができると考えられる(陽性の場合)。一方、CA2 の回収率が十分であるにもかかわらず、NoV が検出されなかった場合は、正しく陰性(トラブルではない)と判定して差支えないことになり、検査精度を担保することができる。

#### 4. 今後の課題

内部標準物質導入については、現在のところ RNA 抽出までは同一工程で行えるものの、その後の cDNA 合成は別々に行う必要があった。そこで、CA2 に対する逆転写専用プライマーを設定することで、cDNA 合成も NoV と同一工程で行えるように改良する余地がある。また、NoV と CA2 の回収率比は 2～3 倍弱であったが、これを 1 に近づけるために、添加量の最適化や、CA4 等の他の CA も候補に加えるといった対応も検討する必要がある。

パントラ法に関する今後の課題として、近年報告が増加しつつある E 型肝炎ウイルス等への適用を進めなければならないが、捕捉抗体の供給源を確保することが重要である。また、発展が著しい次世代シーケンサーを組み合わせた原因解析を視野に入れてゆく必要がある。さらに、本法が有効に活用されるためには、適切な食品サンプルの確保が重要である。具体的には、実際に食卓に供せられる段階の検食(調理から盛り付

けのプロセスを経たもの)を保存するという原則を、事業者に周知する必要がある。また、ウイルスは食品中では増えず付着するのみであることから、分取した食品サンプルに付着していなければ陰性となってしまう。そのため、サンプリングプランや、スケールアップの方法についても検討する余地が残されている。

#### E. 結論

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ない型である NoV GII.17 に対しても適用できるかを検討した。これまでに何度も大流行した GII.4 に感染すると同時に GII.17 の抗体も誘導されるという結果を元に、ガンマグロブリンの再評価を行い、GII.17 に対しても問題なく使用できることを確認した。

パントラ法の根幹をなす試薬であるパンソルビンの品質において、固定の程度が弱い製品が流通していることが判明したが、再固定プロトコルを付加することで、これまでどおり使用することができ、問題は解決した。

パントラ法の回収率を客観的にモニターするために内部標準物質の導入について検討した。CA2 を添加することで、回収率の評価が可能となった。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) 斎藤博之, 野田衛: 食品・臨床材料・ふき取りの前処理法, 食品衛生検査指針

微生物編 改訂第 2 版 2018: 607-618 (2018).

2) 斎藤博之: 一本鎖高次構造多形 (SSCP)解析法, 食品衛生検査指針 微生物編 改訂第 2 版 2018: 647-655 (2018).

3) Aksara Thongprachum, Tsuguto Fujimoto, Sayaka Takanashi, Hiroyuki Saito, Shoko Okitsu, Hiroyuki Shimizu, Pattara Khamrin, Niwat Maneekarn, Satoshi Hayakawa and Hiroshi Ushijima. Detection of nineteen enteric viruses in raw sewage in Japan. *Infection, Genetics and Evolution*, **63**, 17-23 (2018).

4) Sumie Suzuki, Takayuki Konno, Chihiro Shibata and Hiroyuki Saito. Low incidence of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* between April 2016 and March 2017 in Akita prefecture, Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.*, **71**, 477-478 (2018).

5) Takayuki Konno, Shiho Takahashi, chiharu Ogawa, Hiroko Kashio, Yuko Kumagai, Wakako Akino, Hiroyuki Saito, Kazuhito Sasaki, Yuka Kato, Youko Daimon, Mikiko Takashima and Yuto Toyoshima: Detection of multiple pathogens from a patient with traveler's diarrhea and information regarding the tests performed - Akita Prefecture. *Infectious Agents Surveillance Report*, **39** (12), 17-18 (2018).

## 2. 学会発表

1) 斎藤博之、柴田ちひろ、佐藤寛子、清水博之: エンテロウイルス D68 型の乳飲みマウスでの分離例、第 59 回日本臨床ウイルス学会、2018、さいたま

2) Makoto Miyazaki, Hiroyuki Saito, Chihiro Shibata, Doan Hai Yen, Yujiro Arao, Naoko Iwata-Yoshikawa, Hideki Hasegawa, Hiroyuki Shimizu and Noriyo Nagata: Development of a flaccid paralysis mouse model after infection of enterovirus D68. The 20<sup>th</sup> meeting EURO-PIC, Egmond aan Zee, The Netherland (2018).

3) 斎藤博之、秋野和華子、野田衛、上間匡: パンソルビンの再固定によるノロウイルスの回収率向上、第 39 回日本食品微生物学会学術総会、2018、大阪

4) 秋野和華子、斎藤博之、野田衛、上間匡: 市販アサリからのノロウイルス検出状況、第 39 回日本食品微生物学会学術総会、2018、大阪

5) 斎藤博之、原田誠也: 「下痢症ウイルスの効率的スクリーニング」核酸処理、検出一体型病原因子検出システム-FilmArray、第 30 回ウイルス性下痢症研究会学術集会、2018、京都

6) Hiroyuki Saito, Wakako Akino, Hiroko Sato, Youko Fujiya, Chihiro Shibata, Ryoetsu Sato and Hiroyuki Shimizu: Isolation of enterovirus D68 using suckling mice and the background. 第 66 回日本ウイルス学会学術集会、2018、京都

7) 斎藤博之、秋野和華子、佐藤寛子、藤谷陽子、柴田ちひろ、清水博之: 乳飲みマウスによるエンテロウイルス D68 型の分離、

第 32 回秋田応用生命科学研究会講演会、  
2018、秋田

8) 斎藤博之、秋野和華子、佐藤寛子、  
清水優子、早川智、牛島廣治、野田衛、上  
間匡:生カキ喫食後の胃腸炎症例から得ら  
れたノロウイルス感染の特徴、第 114 回日本  
食品衛生学会学術講演会、2018、広島

#### **H. 知的財産権の出願・登録状況**

なし

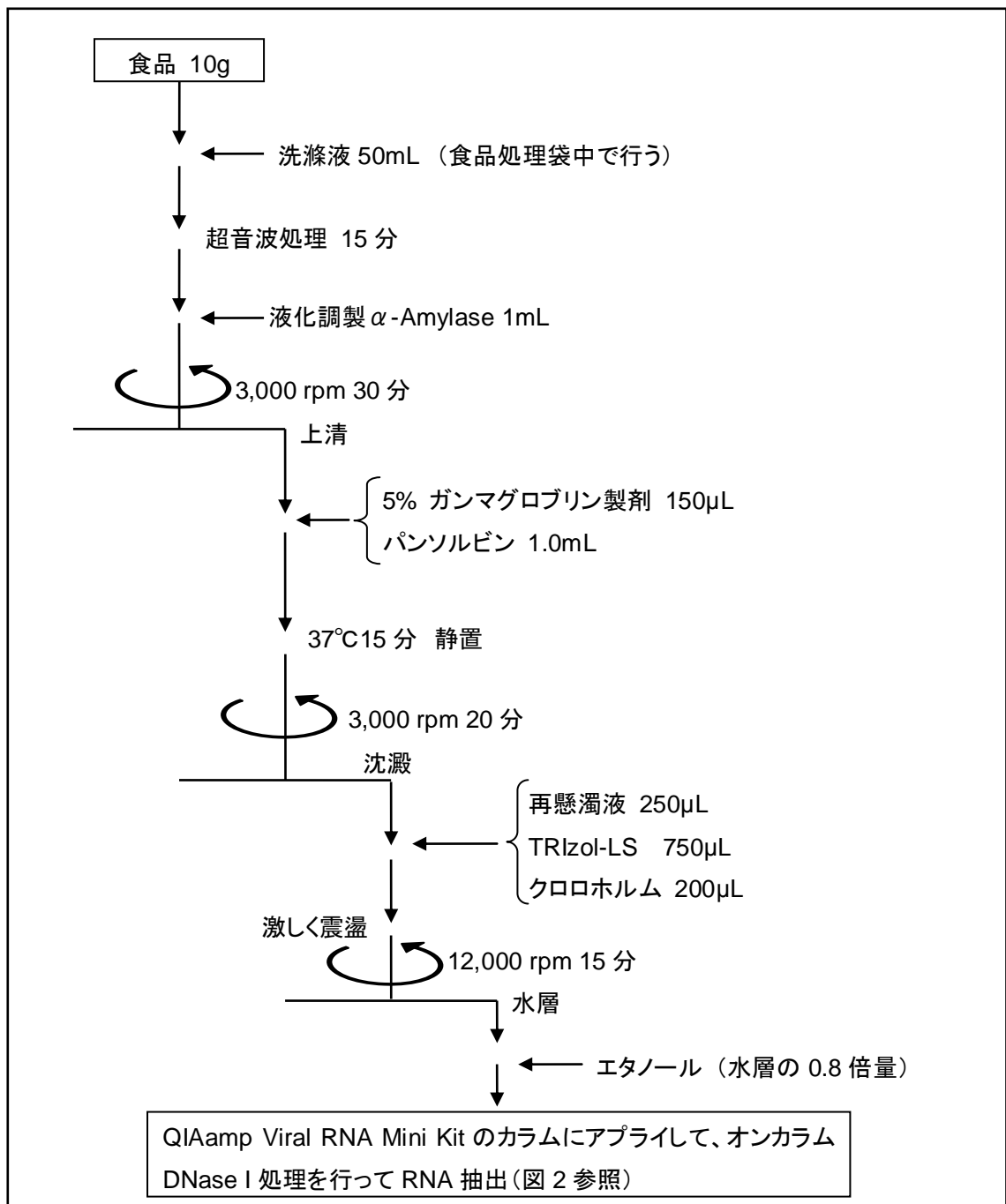


図 1 パンソルビン・トラップ法の操作手順

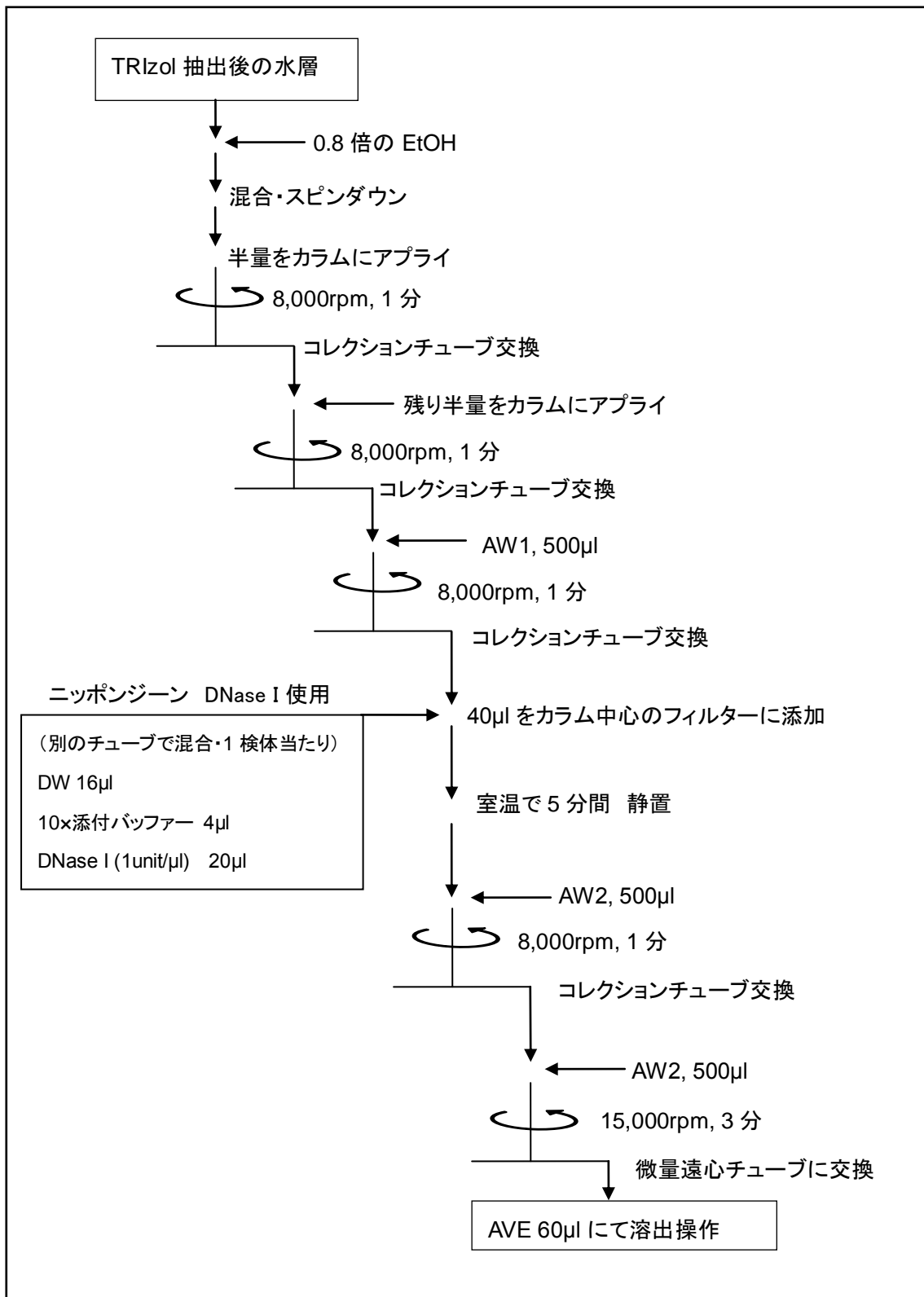


図 2 QIAamp Viral RNA Mini Kit へのオンカラム DNase I 処理の組み込み

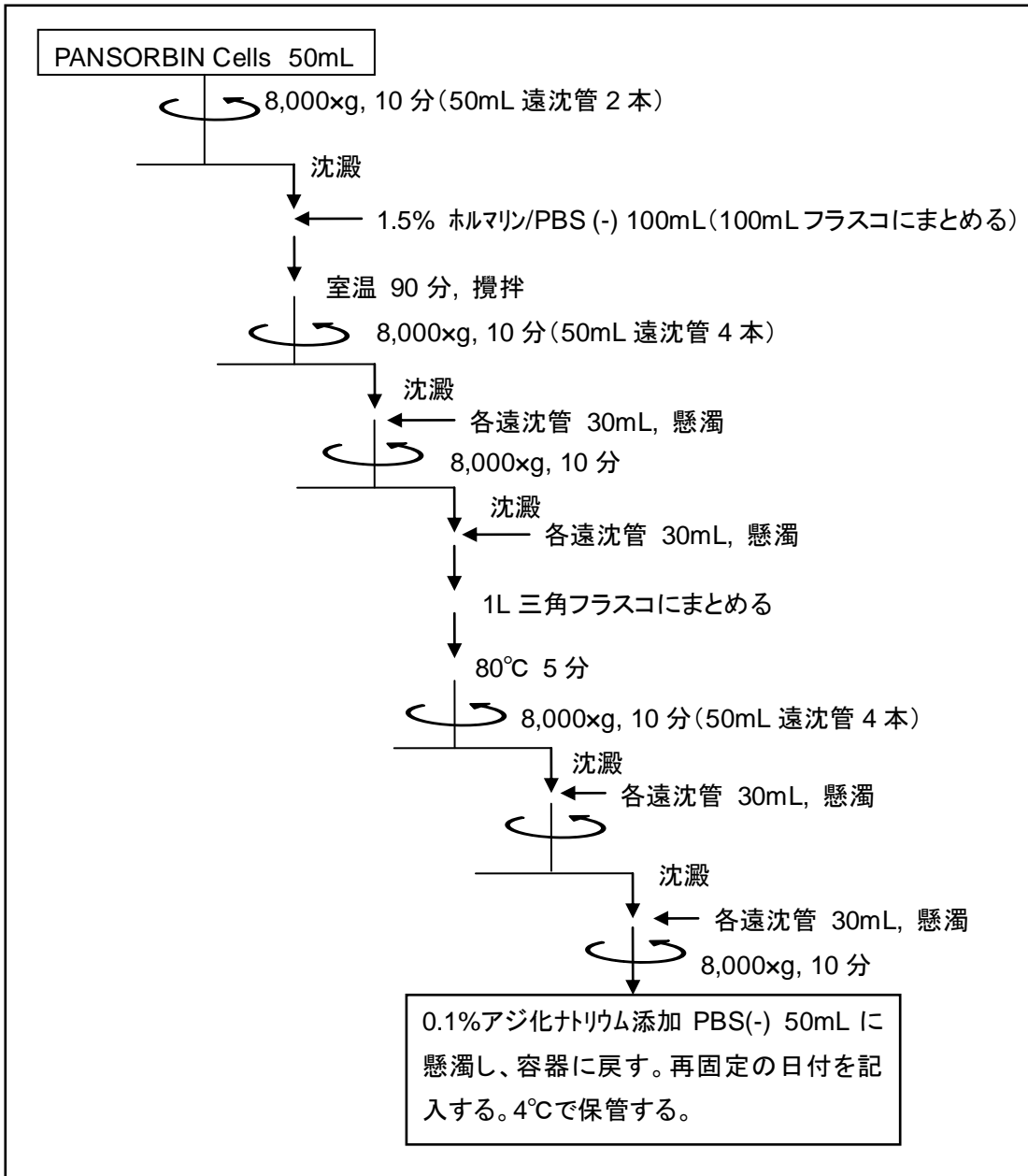


図3 パンソルビン再固定の手順

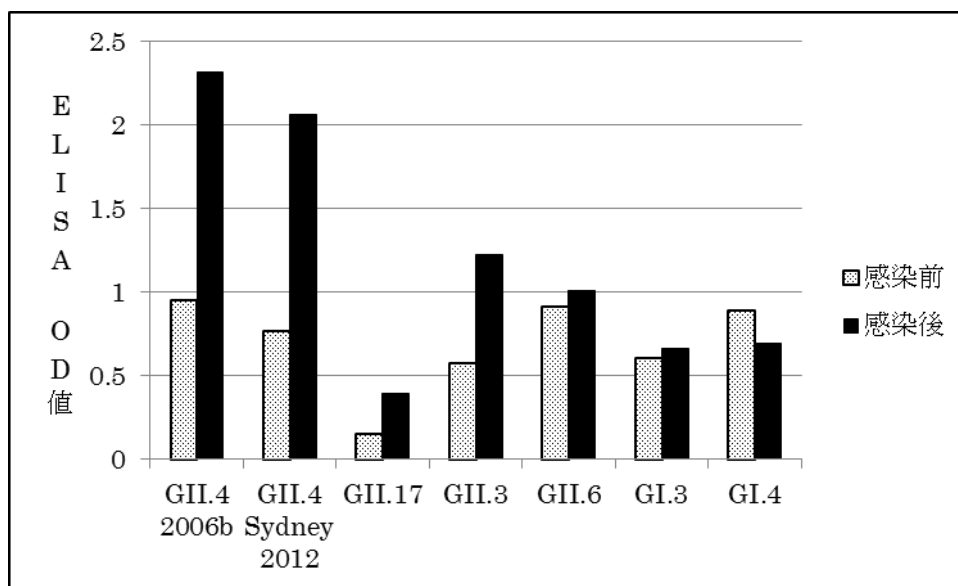


図4 NoV GII.4 感染時における血清 IgG の応答 (ELISA OD 値)

感染日: 2012 年 12 月 4 日

表1 食品洗滌液 50mL からの NoV GII.17 の回収率

遺伝子型	添加量(copies /50mL)	回収量(copies /50mL)	回収率(%)
GII.17	$2.01 \times 10^6$	$7.23 \times 10^4$	3.61
GII.17	$1.46 \times 10^5$	$7.80 \times 10^3$	5.34
GII.17	$1.00 \times 10^4$	$1.06 \times 10^3$	10.60
GII.4(参考値)	$1.16 \times 10^5$	$2.90 \times 10^4$	25.10

表2 食品 10g からの NoV GII.17 の回収率

食品	添加量(copies /g)	回収量(copies /g)	回収率(%)
ポテトサラダ	$1.43 \times 10^5$	$1.05 \times 10^4$	7.35
焼きそば	$1.32 \times 10^5$	$6.67 \times 10^3$	5.04

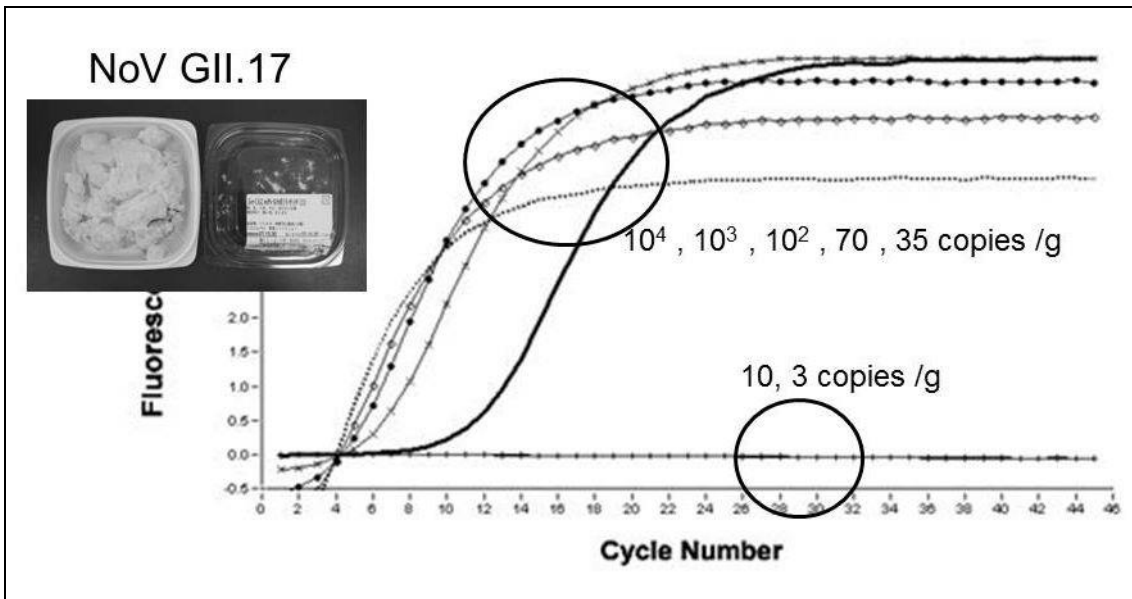


図 5A Nested real-time PCR による検出限界 (ポテトサラダ)

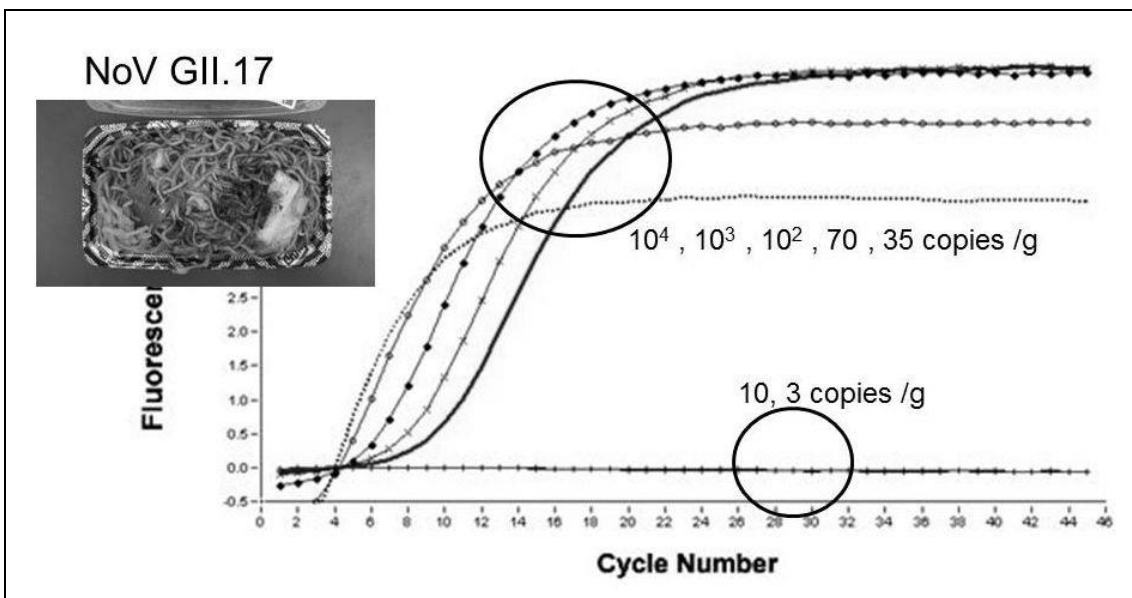


図 5B Nested real-time PCR による検出限界 (焼きそば)



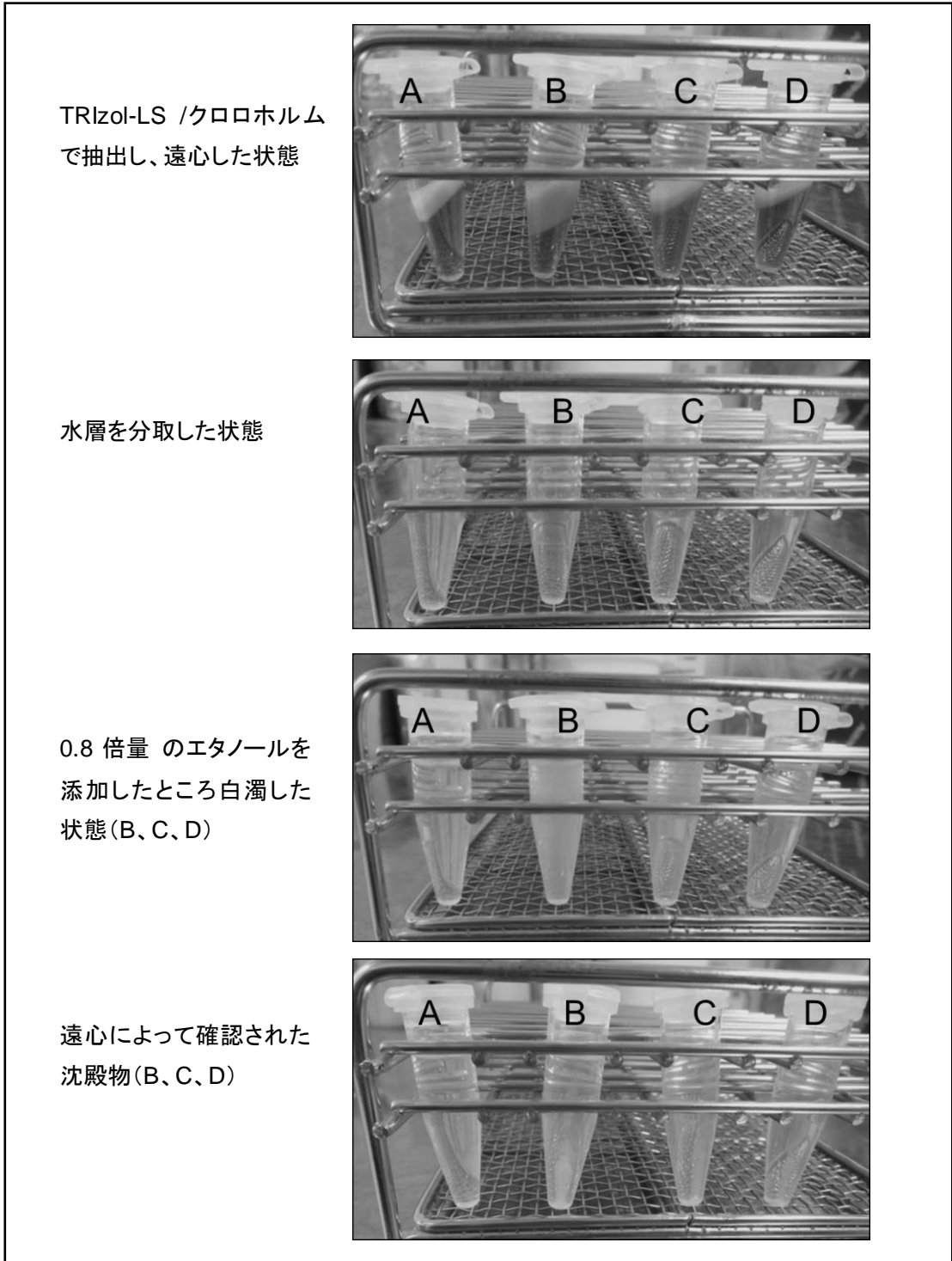


図6 パンソルビンのロット差の比較

A: 2014 年購入、B:2015 年購入、C: 2016 年購入、D: 2017 年購入

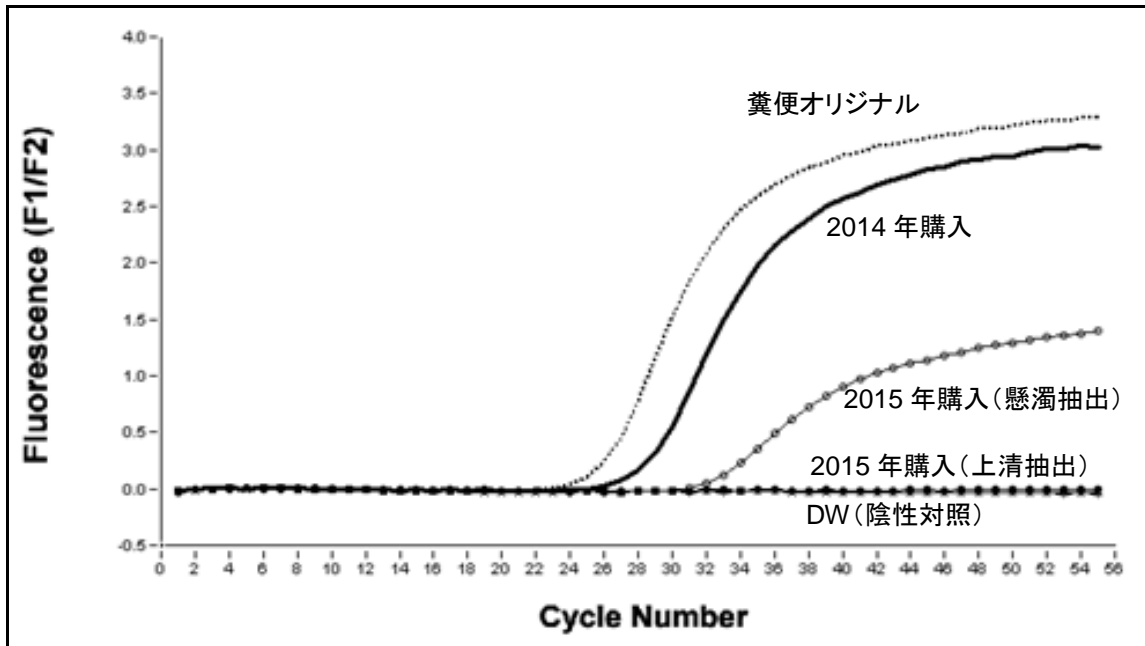


図7 白濁による回収率の低下(増幅曲線)

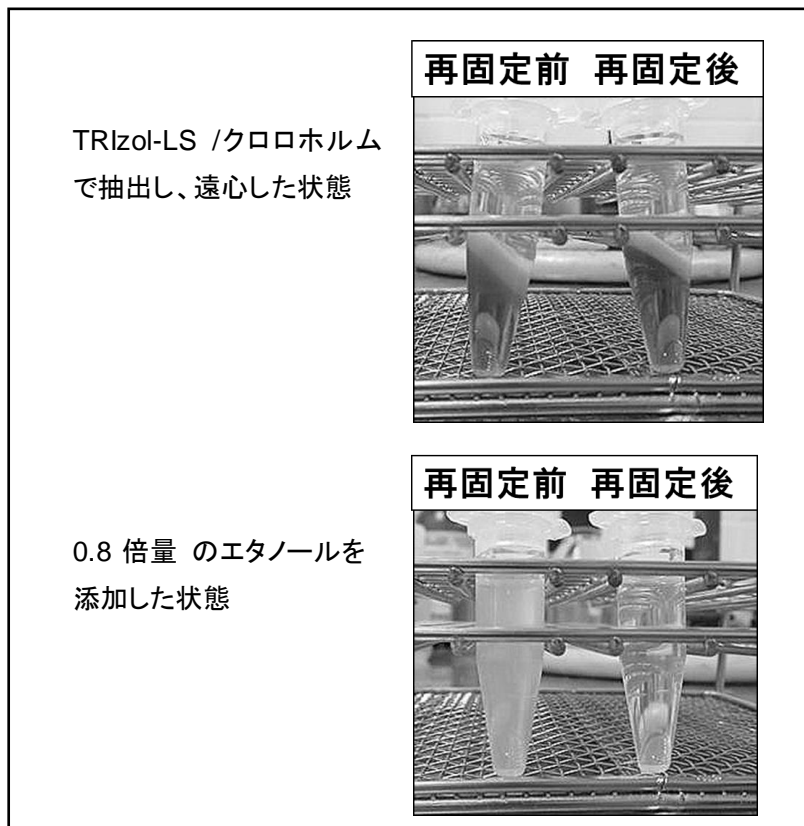


図8 パンソルビン再固定の効果(抽出操作時の観察)

表 3 パンソルビン再固定の効果(回収率の比較)

パンソルビン	回収量(copies /50mL)	回収率 (%)
2014 年購入	2.66×10 <sup>4</sup>	18.0
2015 年購入 (遠心上清)	検出できない	—
2015 年購入 (懸濁状態)	1.01×10 <sup>3</sup>	0.68
2015 年購入 (再固定後)	4.49×10 <sup>4</sup>	30.4

投入量： 1.45×10<sup>5</sup> copies /50mL

表 4 食品洗滌液からの CA、及び Echo-9 の回収率比較

供試ウイルス	投入量(copies /50mL)	回収量(copies /50mL)	回収率 (%)
CA2	2.80×10 <sup>7</sup>	9.35×10 <sup>6</sup>	33.4
CA6	9.12×10 <sup>7</sup>	6.86×10 <sup>6</sup>	7.5
CA16	1.45×10 <sup>8</sup>	2.77×10 <sup>7</sup>	19.2
Echo-9(Hill 株)	6.01×10 <sup>7</sup>	6.14×10 <sup>6</sup>	10.2

表 5 ポテトサラダからの NoV GII.4、及び CA2 の回収率

パンソルビン	回収率 (%)	
	NoV GII.4	CA2
再固定済み	36.8	16.1
再固定なし	4.53	0.78
ガンマグロブリンなし	0.80	N.D.

投入量: NoV GII.4 9.16×10<sup>5</sup> copies /10g、CA2 1.13×10<sup>7</sup> copies /10g

表 6 焼きそばからの NoV GII.4、及び CA2 の回収率

パンソルビン	回収率 (%)	
	NoV GII.4	CA2
再固定済み	34.0	11.4
再固定なし	4.45	0.34
ガンマグロブリンなし	1.44	N.D.

投入量： NoV GII.4  $9.16 \times 10^5$  copies /10g、 CA2  $1.13 \times 10^7$  copies /10g

表 7 ヒジキの煮つけからの NoV GII.4、及び CA2 の回収率

パンソルビン	回収率 (%)	
	NoV GII.4	CA2
再固定済み	14.9	5.33
再固定なし	1.80	0.40
ガンマグロブリンなし	0.30	N.D.

表 8 食品別の NoV GII.4 と CA2 の回収率比

食品	回収率 (%)		回収率比 (NoV / CA2)
	NoV GII.4	CA2	
ポテトサラダ	36.8	16.1	2.29
焼きそば	34.0	11.4	2.98
ヒジキの煮つけ	14.9	5.33	2.80

平成 30 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」  
研究分担報告

### ウイルスの食品検査の精度管理

研究分担者	渡辺 卓穂	一般財団法人食品薬品安全センター
研究協力者	中阪 聡亮	一般財団法人食品薬品安全センター
	上間 匡	国立医薬品食品衛生研究所
	野田 衛	国立医薬品食品衛生研究所
		北海道立衛生研究所
		青森県環境保健センター
		秋田県健康環境センター
		宮城県保健環境センター
		東京都健康安全研究センター
		新潟県保健環境科学研究所
		大阪健康安全基盤研究所
		堺市衛生研究所
		広島市衛生研究所

#### 研究要旨

国内で食品のノロウイルス検査を実施している 9 機関を対象として、昨年度と同様の共通試料を配布することにより外部精度管理調査を行った。検体 7 種〔食品検体：4 種（陰性試料 1 本を含む）、ウイルス懸濁液：3 種（3 種はいずれも同一濃度）、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。なお、繰り返し測定回数は 2 回とした。また、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。その結果、検量線作成では 2 回の測定でばらつきは認められなかった。また、標準 DNA 溶液では実測値における変動係数が 0.015 と昨年度より大きくなったものの非常に小さいものであり、精度良く PCR 操作が実施されているものと考えられた。一方、ウイルス懸濁液では昨年度と同様に変動係数は約 0.1 であった。さらにきな粉を基材とした食品検体では、濃縮工程を含めた外部精度管理調査を行ったところ、変動係数は従来方式において 0.5~0.6 を示した。また、国際的に推奨されているロバスト統計量を算出したところ、変動係数はウイルス懸濁液では約 0.12、模擬食品検体では 0.6 となり、昨年度より大きくなった。

これは、昨年度とロットの違う検体を用い、実施者も違っていたことが原因と推察された。しかし、食品検体を採用することで、変動係数は大きくなるものの、参加機関を評価するには許容できるばらつきであると考えられた。

## A. 研究目的

食品検査はその食品の安全性を担保するためのひとつの手段であるが、この検査結果をもって市場への流通の可否を判定することとなるため、その結果の妥当性を明確にする必要がある。また、一定の基準で結果を判断するためには、どの検査機関で実施しても同等の検査結果が得られることが求められる。そのためにも結果の信頼性を確保する必要があり、食品検査については平成9年度より業務管理が導入された。また、国際的な試験所認定でもあるISO/IEC17025では定期的な技能試験への参加が求められている。現在、一般的な微生物検査については国内においても技能試験が実施されているが、ノロウイルス検査については国内では導入されていない。また、これまでの結果から各検査機関で使用している検量線作成用陽性コントロールDNA溶液濃度にばらつきがあること、外部精度管理調査結果においてばらつきを小さくするためには、試験方法や検査担当者等を限定する必要があることがわかった。そのため、本研究では、模擬食品検体を含めた共通検体を用いた外部精度管理調査を行うことにより、結果のばらつき評価を行うこと、ならびに得られた結果をもとに各検査機関の評価方法を確立することを目的とした。

## B. 研究方法

### 1. 調査試料

調査試料は検査試料〔きな粉を基材とした食品検体とウイルス懸濁液（ノロウイルス GII 陽性の10%肉エキス加PBS(-)）および標準DNA溶液とした。このうち、検査試料については各3本（いずれも同一濃度）とし、模擬食品検体の1本については陰性とした。なお、検体-1～検体-4を食品検体、検体-5～検体-7をウイルス懸濁液とした。また、標準DNA溶液については濃度未知の1本とした。調査試料の均質性の確認は、国立医薬品食品衛生研究所で実施した。

### 2. 外部精度管理調査の実施

協力機関である9機関を対象として、国立医薬品食品衛生研究所より調査試料の発送を行った。なお、検査方法については、あらかじめ指定した共通の検査方法（QIAamp Viral RNA Miniキットを用いたRNAの抽出、DNase処理、逆転写反応およびリアルタイムPCRの実施）とした（表1）。同様に食品検体の濃縮法についても指定した。また、検量線作成用陽性コントロールDNA溶液は共通とし、調査試料と同時に配布した。各検査機関における繰り返し測定回数はそれぞれ2回とした。各検査機関より各調査検体のCt値、実測値および換算値を回収し、得られた結果について統計解析を行った。基本統計量の算出は、従来より実施している積率の統計量（従来方式）と国際的に推奨されているロバスト統計量（ロバスト方式）

の 2 種とした。なお、ロバスト方式による解析では Huber の H15/proposal 2 を採用した。あわせて、採用した検査方法についても回収した (表 2)。なお、統計解析、Xbar-R 管理図を参考とした管理図および z-スコア管理図の作成には JMP ver. 11 を使用した。

(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. 検量線の解析

各検査機関において作成された検量線について解析を行った。その結果、全ての検査機関で同等の検量線を作成していたが (図 1)、2 回の繰り返し測定において作成された検量線は 3 種のパターンに分類された。すなわち、2 回の繰り返し測定においてほぼ同等の Ct 値が得られる

(A)、高濃度域ではほぼ同等の Ct 値が得られているが、低濃度域においてわずかにばらつきが生じる (B)、および全濃度範囲において同様の傾向が得られているがわずかにずれが生じている (C) である

(図 2)。このうち、C のパターンは 1 機関のみであったが、検量線の傾向は同様であった。

### 2. 調査試料における Ct 値の解析

標準 DNA 溶液および検査試料の Ct 値について観察した。その結果、標準 DNA 溶液では約 1 サイクルの範囲に、ウイルス懸濁液では約 4 サイクルの範囲に、食品検体では約 6 サイクルの範囲にあった (図 2)。

### 3. 調査試料における実測値の解析

実測値について観察したところ、標準 DNA 溶液および検査試料の対数解析での基本統計量は表 3 のとおりであった。また、データ分布、ヒストグラムおよび正規確率プロットを図 3~7 に示す。食品検体において 1 機関で他の検査機関と比較して Ct 値が小さい値を示しているが、少なくとも標準 DNA 液やウイルス懸濁液では他の検査機関を同等の値を示していることから、食品からの抽出および濃縮工程に問題がある可能性が考えられる。なお、検体-3 については全ての検査機関で陰性と報告した。検査試料はいずれも 3 本で同一濃度であったが、検査試料間の平均値の比較を行ったところ、ウイルス懸濁液および食品検体のいずれにおいても有意差は認められなかった。従来方式と国際的な推奨方法であるロバスト方式で平均値を比較するとよく一致していた。これに対して標準偏差では標準 DNA 溶液とウイルス懸濁液といった従来から使用している検体では比較的近い数値が得られたが、食品検体ではロバスト方式のほうが明らかに大きかった。これは、昨年度使用した食品検体に加え、新たに作製した検体も含まれており、ロット間差の影響であると考えられた。

### 4. 調査試料における換算値の解析

検査試料の 1 mL あたりの換算値の対数解析での基本統計量は表 5 のとおりであった。実測値の場合と同様、報告値の平均値において検査試料間で有意差は認められなかった (データには示していない)。また、換算値は実測値から係数を掛けることによって算出されることから、報告

値の分布が実測値と大きく変わらないため、変動係数は実測値と比較すると小さくなった。

#### 5. 外部精度管理調査の評価方法の検討

外部精度管理調査における最終的な目的は参加機関から提出された結果の評価を行うことである。そこで、上記の解析により得られた統計量を用いた評価を行った(図8～図14)。すなわち、今回の外部精度管理調査では2回の繰り返し測定を行ったことから、2回の測定の差、すなわちRを評価対象として加え、 $\bar{X}-R$ 管理図を参考とした評価を行うこととした。 $\bar{X}-R$ 管理図を代用した評価は、食品衛生外部精度管理調査でも採用されている方法であるが、食品衛生外部精度管理調査のように添加回収等を指標とした管理限界線の設定ができないことから、zスコアにおける判断基準である $|z\text{-スコア}|=2$ および3を管理限界線として採用し評価を行った。その結果、ウイルス懸濁液ですべての機関でzスコアが2以上となったが、食品検体ではいずれも正しく検査が実施されていた。また、R管理図では標準DNA液および検体-5、-7で管理限界線を超える機関が1機関認められた。

#### D. 考察

各検査機関より回収した検量線の相関係数はいずれも0.99以上であり、問題ないと考えられた。また、一部の機関において低濃度域でばらつきが認められたが、この原因は不明であった。なお、今回の検量線は $10^1$ コピーを最小濃度としているが、この濃度以上の範囲においては直線的に定量可能であることが明らかとな

った。一方、標準DNA溶液では実測値の範囲が0.3と非常に小さく、昨年度と同様に精度良くPCR操作が実施されているものと考えられた。また、ウイルス懸濁液についてはこれまでも継続的に実施していることもあり、範囲も1以内であった。これまで参加機関の評価を行うために結果のばらつきを小さくするためのスキームを計画してきたが、そのひとつの要因として検量線作成用陽性コントロールDNA溶液共通配布が挙げられる。しかし、実際の検査業務ではそれぞれの検査機関で陽性コントロールDNA溶液を用意することから、今後はより実際の検査体制を踏まえたうえでの外部精度管理調査を実施してもよいのかもしれない。なお、ウイルス懸濁液については同一濃度の3本の平均値を比較してもほぼ同等の値となっていることから、各検査機関が安定して検査を行っていることの証明にもなるものであると考えられる。これに対して、昨年度に引き続ききな粉を用いた食品検体を採用し、濃縮工程を含んだ外部精度管理調査を実施した。昨年度の予測では各検査機関で濃縮工程に伴うばらつきが非常に大きくなると考えていたが、実際のロバスト方式における変動係数は0.2から0.3であり、ウイルス懸濁液の約2倍の値であったことから、参加機関の評価に十分耐えうるばらつきであるものと考えられた。しかし、今年度はロバスト方式における変動係数は0.6となり、ウイルス懸濁液の4倍となってしまった。昨年度と同様の検体を用いたのかかわらずこのような違いが認められた原因を精査した結果、新たに作製した検体も使



用していたことが判明し、検体の問題であることが確認された。また、実施者が昨年度と異なっていたことも確認された。これを踏まえると、昨年度の結果と同様であることが推測されることから、今後のノロウイルス検査の外部精度管理調査における基本的な統計解析方法はロバスト統計量を用いることが望ましいものと考えられた。さらにこのロバスト統計量を用いた各参加機関の評価を Xbar-R 管理図で行った。その結果、標準 DNA 溶液とウイルス懸濁液すべてにおいて z スコアの絶対値が 2 以上となる検査機関が検出された。しかし、z スコアの絶対値が 2 以上となった標準 DNA 溶液における検査機関の実測値はばらつきが少ないため、明らかな異常値であると判断することはできないと考えられる。すなわち、z スコアを用いた評価を行うにあたり、報告値から算出された標準偏差を用いた場合に、ばらつきが明らかに小さいときには標準偏差が小さくなり、結果として異常値として検出される検査機関が発生する可能性がある。そのため、実測値との併行評価や経験則に基づいた標準偏差を設定することが、より正しい参加機関の評価を行うために求められると思われる。

## E. 結論

ノロウイルス GII 陽性または陰性の検査試料、合計 7 種（食品検体とウイルス懸濁液）と標準 DNA 溶液を調査試料として採用した外部精度管理調査を 9 機関を対象に実施した。その結果、標準 DNA 溶液では実測値において 0.015 という非常

に小さな変動係数が得られた。一方、ウイルス懸濁液では 0.13 であった。これらのことから参加した検査機関が非常に精度良く検査を遂行しているものと考えられた。また、きな粉を基材とした食品検体についても実施したが、変動係数は 0.6 であり、昨年度に比べ大きくなり、ウイルス懸濁液と比較しても約 4 倍であった。しかし、これは検体の問題であることがわかり、昨年度と同等の結果が得られたと考えられた。これらの統計量をもとに参加機関の評価を Xbar-R 管理図を用いて行ったところ、標準 DNA 溶液とウイルス懸濁液すべてにおいて z スコアの絶対値が 2 以上の検査機関が検出された。しかし、標準 DNA 溶液における限界外機関の実測値は平均値と比較して、明らかな異常値とは判断することができないと考えられた。このことは結果報告値をもとに算出した標準偏差を用いることの問題点としても考えられることから、ノロウイルス検査における適正な標準偏差を経験則をもとに求めることも必要であると考えられた。また、食品検体を用いた際にも参加機関の評価を実施するに耐えうる統計量が得られたことから、カキのような実際の検査事例として多いものを検体として採用することも検討する必要があると考えられた。

## 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

表1 指定した検査方法の詳細

検査方法		初期設定	
RNA抽出	RNA抽出キット	QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, 52904)	
DNase処理	DNase	Recombinant DNase I (タカラ, No. 2270A)	
	Buffer	5 × First-Strand Buffer: Super Script II RNase H- Reverse Transcriptase (life technologies, 18064-01) に添付	
	装置		
逆転写反応	逆転写酵素	Super Script II RNase H- Reverse Transcriptase ( life technologies, 18064-014):	
	反応バッファー	反応用バッファー(5 × SSII Buffer ) および 100mM DTT	
	RNaseインヒビター	Recombinant Ribonuclease Inhibitor (タカラ, 2313A)	
	cdNTPs mix	10mM dNTPs mix ( life technologies, 18427-013)	
	プライマー	ランダムプライマー (life technologies, 48190-011)	
	装置		
リアルタイムPCR	マスターミックス	Taq Man Universal Master Mix	
	プライマー(合成受託会社)	COG2F	
		ALPF	
		COG2R	
	プローブ(合成受託会社)	RING2AL-TP	
リアルタイムPCR装置	7500(life technologies)		

表2 各検査機関における採用手法(1/2)

検査方法	機関A	機関B	機関C	機関D	機関E
RNA抽出	RNA抽出キット QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, 52904)	QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, 52904)	Deoxyribonuclease(RT Grade)(ニッポンゼン, No.313-03161)	QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, 52904)	QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, 52906)
Dnase処理	Recombinant DNase I(タカラ, No.2270A) 5 x First-Strand Buffer: Super Script II RNase H- Reverse Transcriptase (life technologies, 18064-01)に添付 ABI 2720 (life technologies)	Recombinant DNase I(タカラ, No.2270A) 5 x First-Strand Buffer: Super Script II RNase H- Reverse Transcriptase (life technologies, 18064-01)に添付	Deoxyribonuclease(RT Grade)(ニッポンゼン, No.313-03161) 5 x First-Strand Buffer: Super Script II RNase H- Reverse Transcriptase (life technologies, 18064-01)に添付 BT-23 (ヤマト科学株式会社)	Recombinant DNase I(タカラ, No.2270A) 5 x First-Strand Buffer: Super Script II RNase H- Reverse Transcriptase (life technologies, 18064-01)に添付	Recombinant DNase I(タカラ, No.2270A) 5 x First-Strand Buffer: Super Script II RNase H- Reverse Transcriptase (life technologies, 18064-01)に添付
逆転写反応	Super Script II RNase H- Reverse Transcriptase ( life technologies, 18064-014): 反応用バッファー(5 x SSII Buffer) および100mM DTT Recombinant Ribonuclease Inhibitor(タカラ, 2313A) Expand High Fidelity PCR System, dNTPPack (Roche, 04738276001)に添付のもの ランダムプライマー ( life technologies, 48190-011)	Super Script II RNase H- Reverse Transcriptase ( life technologies, 18064-014): 反応用バッファー(5 x SSII Buffer) および100mM DTT Recombinant Ribonuclease Inhibitor(タカラ, 2313A) 100mM dNTPs Set ( life technologies, 10297018) Random Hexamer ( life technologies, N8080127) Gene Amp® PCR System 9700	Super Script II RNase H- Reverse Transcriptase ( life technologies, 18064-014): 反応用バッファー(5 x SSII Buffer) および100mM DTT Recombinant Ribonuclease Inhibitor(タカラ, 2313A) Deoxynucleotide (dNTP) Solution Mix (New England Biolabs, N0447S) ランダムプライマー ( life technologies, 48190-011)	Super Script II RNase H- Reverse Transcriptase ( life technologies, 18064-014): 反応用バッファー(5 x SSII Buffer) および100mM DTT Recombinant Ribonuclease Inhibitor(タカラ, 2313A) 10mM dNTPs mix (life technologies, 18427-013) ランダムプライマー ( life technologies, 48190-011)	Super Script II RNase H- Reverse Transcriptase ( life technologies, 18064071): 反応用バッファー(5 x SSII Buffer) および100mM DTT RNase インヒビター(ナカライテス ク30260-96) 2.5mM dNTP Mixture ( タカラSD0304) Random Primer(タカラ3801) Astec PC-805
リアルタイムPCR	マスターミックス プライマー (含成受託会社) プローブ(含成受託会社) リアルタイムPCR装置	TaqMan Universal Master Mix life technologies life technologies life technologies life technologies	LightCycler480 Probes Master (Roche Diagnostics) アスマック 日本遺伝子研究所 アスマック Thermo Scientific LightCycler480 (Roche Diagnostics)	Taq Man Universal Master Mix invitrogen invitrogen invitrogen ABI QuantStudio 7 Flex (life technologies)	Taq Man Universal Master Mix シグマ シグマ シグマ Applied Biosystems 7900(life technologies)

表2 各検査機関における採用手法(2/2)

検査方法		機関F	機関G	機関H	機関I
RNA抽出	RNA抽出キット	QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, 52904)	QIAamp Viral RNA Mini QIAcube Kit (QIAGEN, 52926)	QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, 52904)	QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, 52904)
	Dnase処理	Recombinant DNase I(タカラ, No. 2270A) 5 x First-Strand Buffer: Super Script II RNase H- Reverse Transcriptase (life technologies, 18064-01)に添付 Mastercycler gradient (epENDORF)	Recombinant DNase I(タカラ, No. 2270A) 5 x First-Strand Buffer: Super Script II RNase H- Reverse Transcriptase (life technologies, 18064-01)に添付	Recombinant DNase I(タカラ, No. 2270A) 5 x First-Strand Buffer: Super Script II RNase H- Reverse Transcriptase (life technologies, 18064-01)に添付 TakaRa PCR Thermal Cycler Dice TP600(タカラバイオ)	Recombinant DNase I(タカラ, No. 2270A) 5 x First-Strand Buffer: Super Script II RNase H- Reverse Transcriptase (life technologies, 18064-014)に添付 1回目:ASTEC PC350 2回目:ASTEC-PCR815
逆転写反応	逆転写酵素	Super Script II RNase H- Reverse Transcriptase ( life technologies, 18064-014):	Super Script II RNase H- Reverse Transcriptase ( life technologies, 18064-014):	Super Script II RNase H- Reverse Transcriptase ( life technologies, 18064-014):	Super Script II RNase H- Reverse Transcriptase ( life technologies, 18064-014):
	反応バッファ	反応用バッファ(5 x SSII Buffer) および100mM DTT	反応用バッファ(5 x SSII Buffer) および100mM DTT	反応用バッファ(5 x SSII Buffer) および100mM DTT	反応用バッファ(5 x SSII Buffer) および100mM DTT
	RNaseインヒビター	Recombinant Ribonuclease Inhibitor(タカラ, 2313A)	Recombinant Ribonuclease Inhibitor(タカラ, 2313A)	Recombinant Ribonuclease Inhibitor(タカラ, 2313A)	Recombinant Ribonuclease Inhibitor(タカラ, 2313A)
	cdNTPs mix	10mM dNTPs mix (life technologies, 18427-013)	PCR Nucleotide Mix (Roche, 11814362001, 10 mM each)	10mM dNTPs mix(life technologies, 18427-013)	10mM dNTPs mix (life technologies, 18427-013)
	プライマー	Random 6mers (タカラ, RR037A)	Primer "random" (Roche, 11034731001)	ランダムプライマー ( life technologies, 48190-011)	ランダムプライマー ( life technologies, 48190-011)
	装置	Mastercycler gradient (epENDORF)		TakaRa PCR Thermal Cycler Dice TP600(タカラバイオ)	1回目:ASTEC PC815 2回目:ASTEC GeneAtlas485
リアルタイムPCR	マスターミックス	Taq Man Universal Master Mix life technologies japan	Taq Man Universal Master Mix	Taq Man Universal Master Mix	Taq Man Universal PCR Master Mix (life technologies)
	プライマー (合成受託会社)	ALPF		アスミック	アスミック
	ブローブ(合成受託会社)	COG2R		アスミック	アスミック
		RINGZAL-TP			
		リアルタイムPCR装置	7500(life technologies)	7500(life technologies)	7500 Fast(life technologies)

表3 ノロウイルス検査の外部精度管理調査結果の概要(実測値)

検体	従来方式				ロバスト方式			
	平均	±	標準偏差	変動係数	平均	±	標準偏差	変動係数
ウイルス懸濁液								
検体-5	2.26440	±	0.308849	0.136393	2.29355	±	0.281396	0.122690
検体-6	2.27013	±	0.343349	0.151246	2.31044	±	0.291018	0.125958
検体-7	2.30508	±	0.333366	0.144622	2.34062	±	0.292639	0.125026
食品検体								
検体-1	0.977232	±	0.509170	0.521033	0.977232	±	0.577090	0.590536
検体-2	0.861950	±	0.492468	0.571342	0.857604	±	0.549152	0.640333
検体-4	0.901683	±	0.503327	0.558208	0.901683	±	0.570467	0.632669
標準DNA液	5.65030	±	0.085974	0.015216	5.65613	±	0.084216	0.014889

単位: log(コピー)

表4 ノロウイルス検査の外部精度管理調査結果の概要(換算値)

検体	従来方式				ロバスト方式			
	平均	±標準偏差	変動係数	平均	±標準偏差	変動係数	変動係数	
ウイルス懸濁液	検体-5	4.39036	± 0.406342	0.092553	4.39036	± 0.460545	0.104899	
	検体-6	4.39608	± 0.425831	0.096866	4.39608	± 0.482634	0.109787	
	検体-7	4.43104	± 0.428865	0.096787	4.43104	± 0.486072	0.109697	
食品検体	検体-1	3.58868	± 0.320741	0.089376	3.49580	± 0.549347	0.157145	
	検体-2	3.59936	± 0.421471	0.117096	3.35094	± 0.516205	0.154048	
	検体-4	3.49070	± 0.375093	0.107455	3.40051	± 0.542175	0.159439	

単位: log(COPI<sup>+</sup>/mL)

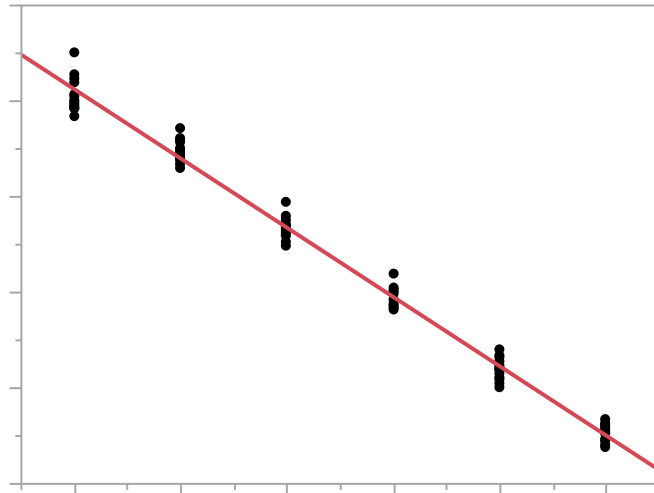


図1 各検査機関の検量線のまとめ



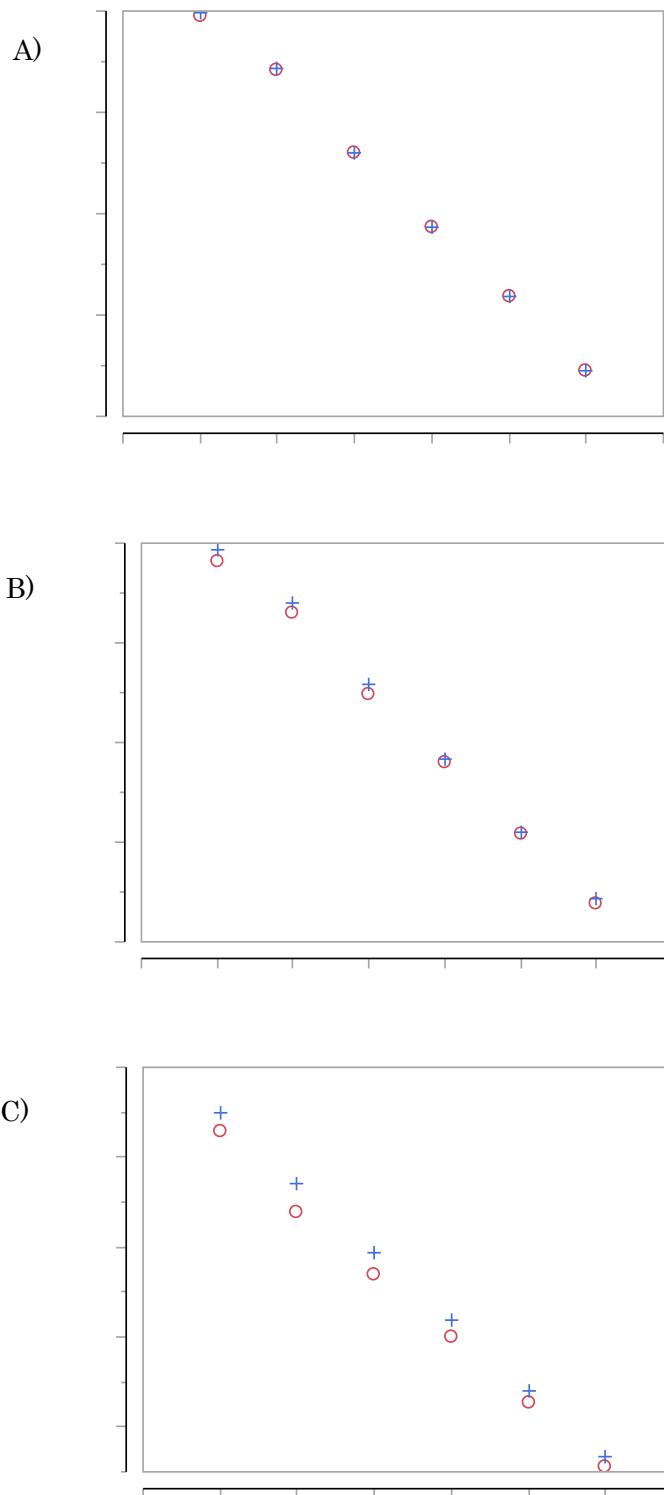
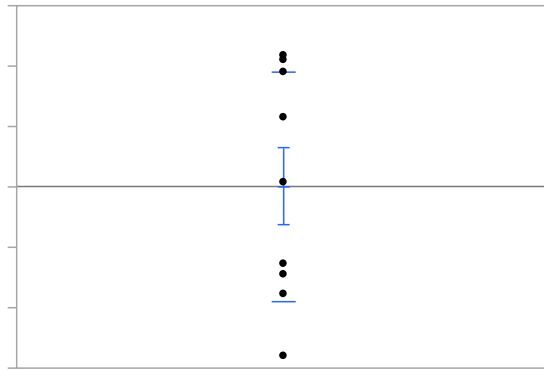
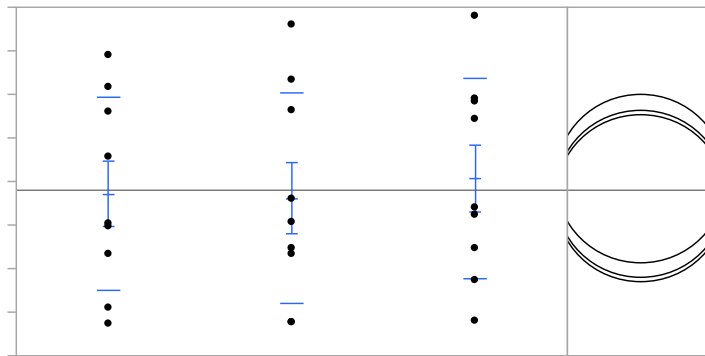


図2 検量線の代表的なパターン  
 ○、+は1回目及び2回目の検量線の測定値を示す。

標準 DNA 溶液



食品検体



ウイルス懸濁液

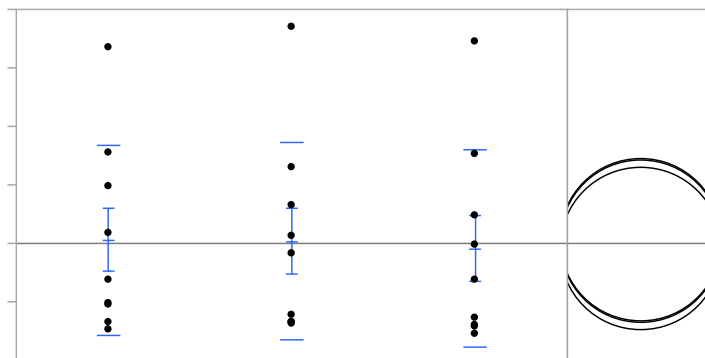
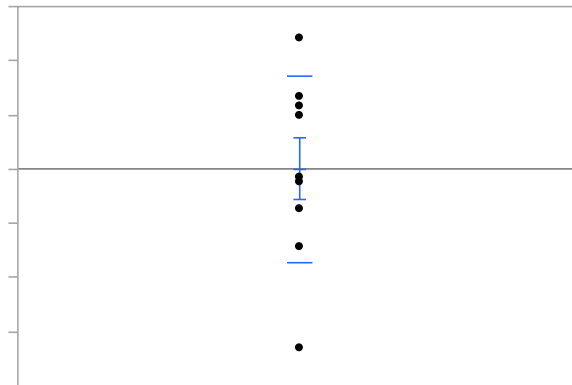


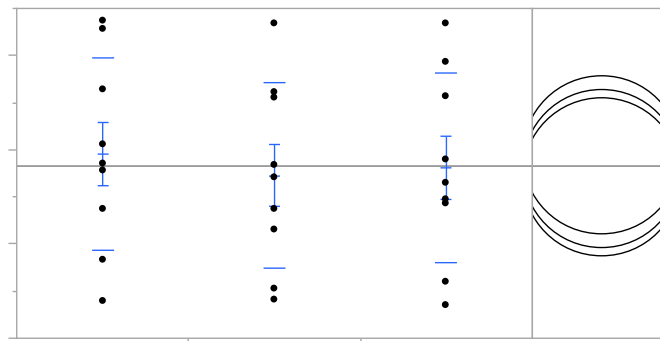
図 3 調査試料における Ct 値のデータ分布

ウイルス懸濁液および食品検体における平均値の比較は Turkey-Kramer の HSD 検定により行った。

標準 DNA 溶液



食品検体



ウイルス懸濁液

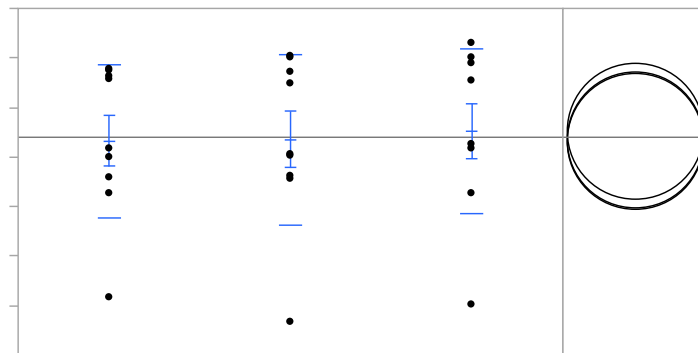


図 4 調査試料における実測値のデータ分布

ウイルス懸濁液および食品検体における平均値の比較は Turkey-Kramer の HSD 検定により行った。

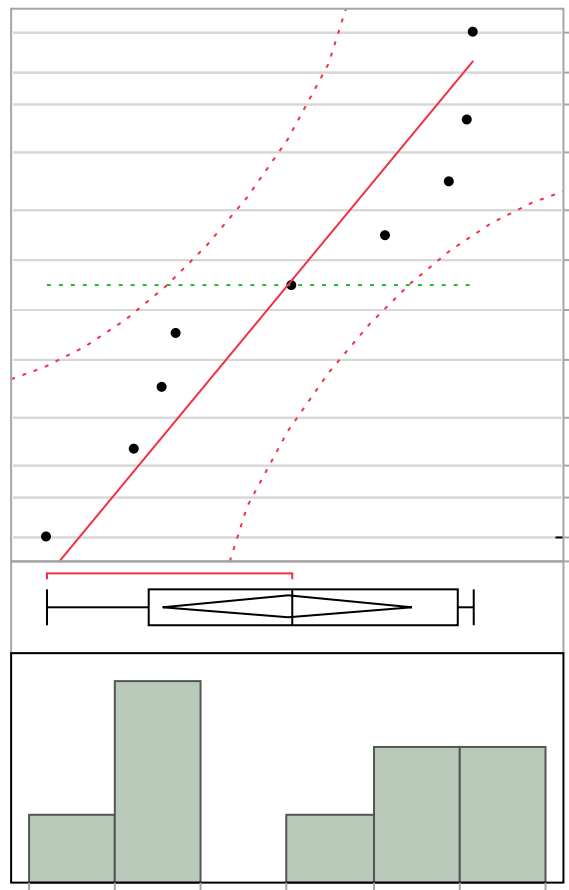


図5 標準 DNA 溶液におけるヒストグラムと正規確率プロット (実測値)

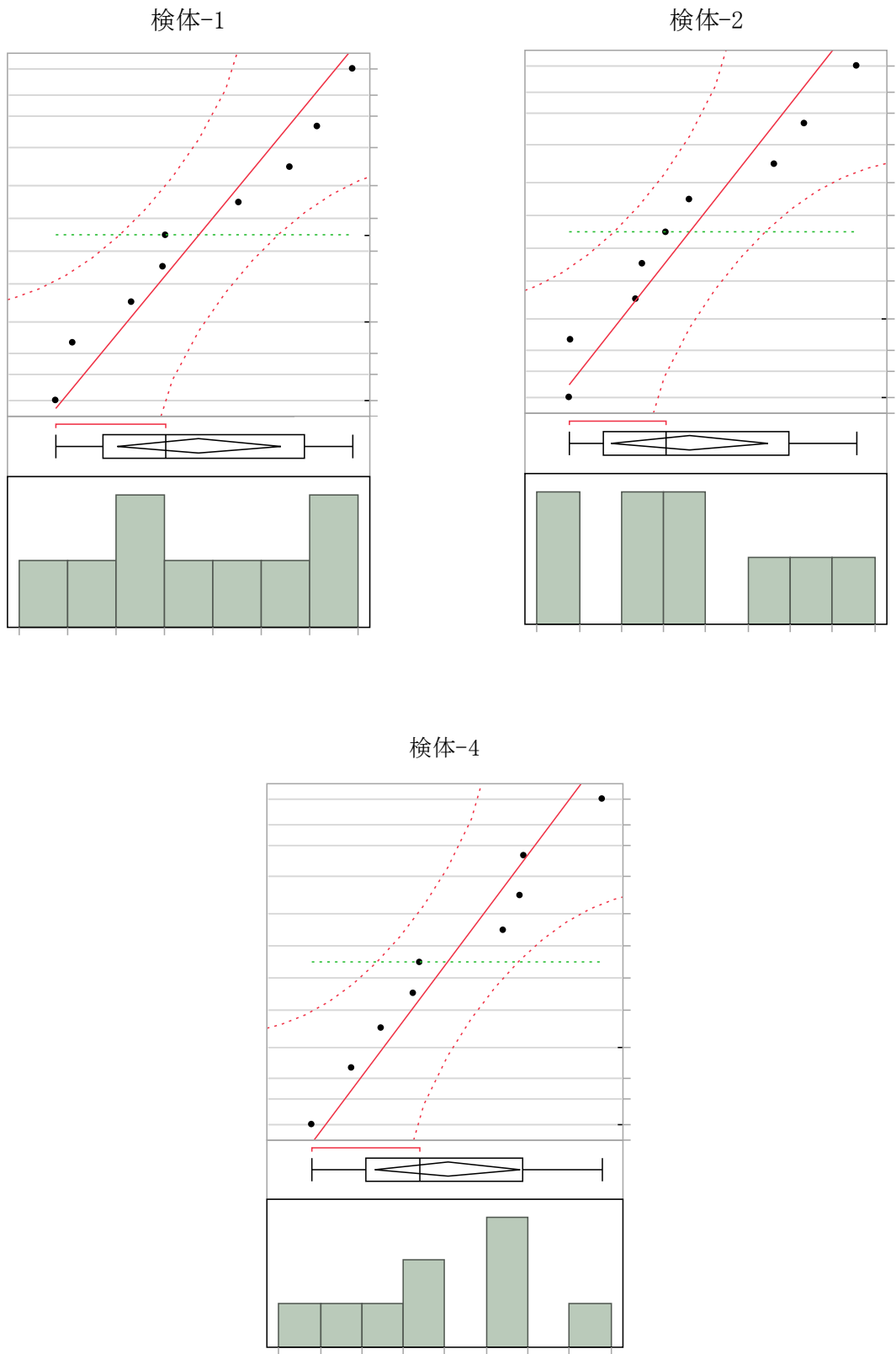
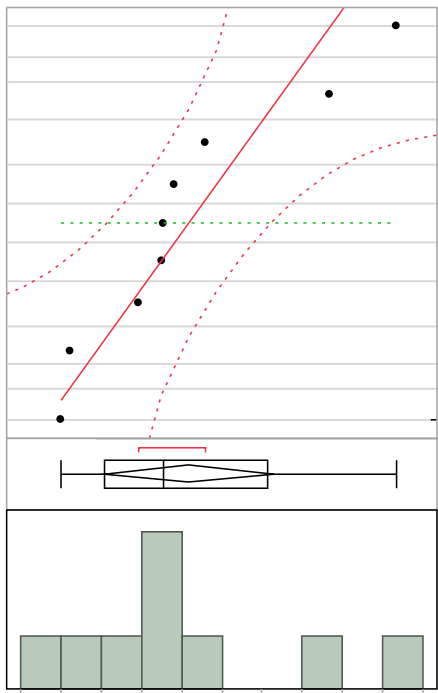
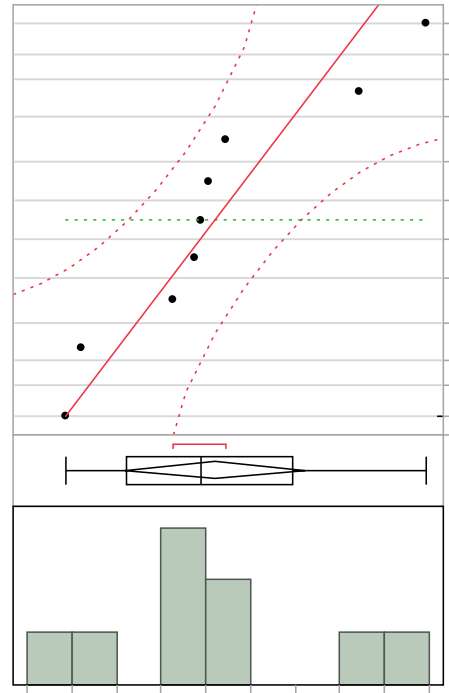


図6 食品検体におけるヒストグラムと正規確率プロット（実測値）

検体-5



検体-6



検体-7

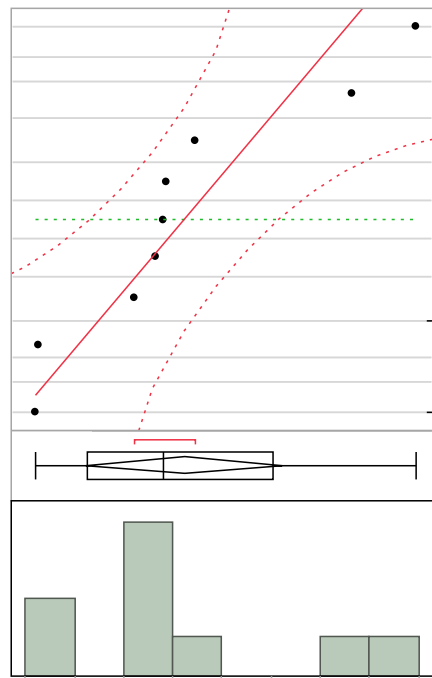


図7 ウイルス懸濁液におけるヒストグラムを正規確率プロット（実測値）

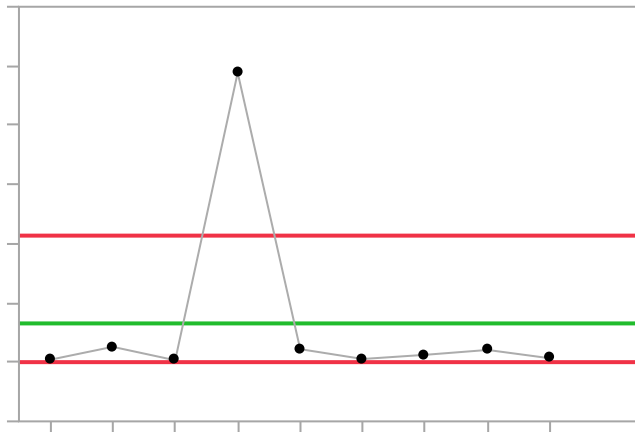
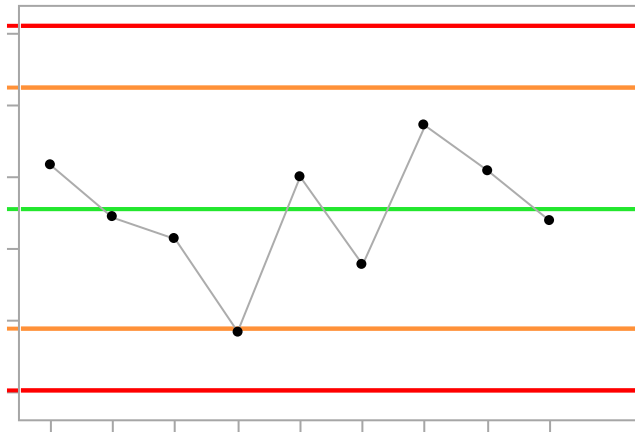


図 8 標準 DNA 溶液における Xbar-R 管理図による評価 (実測値)  
 Xbar 管理図における管理限界線は $|z\text{-スコア}|=2$ および $3$ とした。

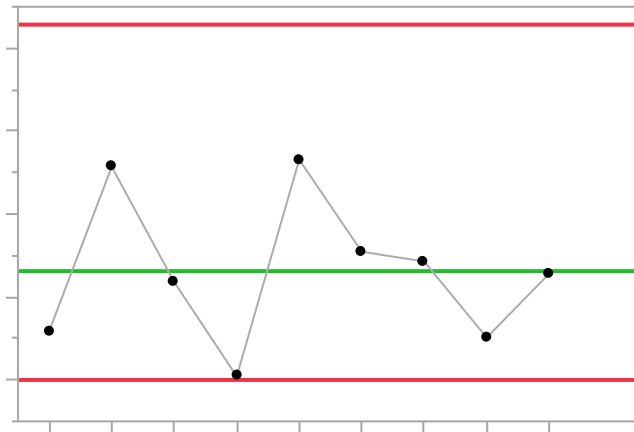
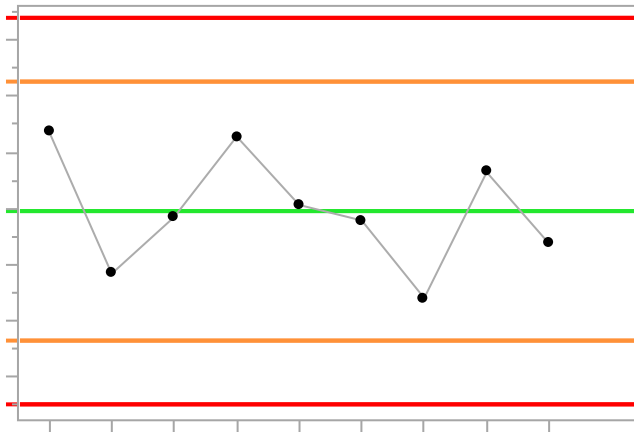


図9 検体-1における Xbar-R 管理図による評価（実測値）  
 Xbar 管理図における管理限界線は $|z\text{-スコア}|=2$ および $3$ とした。



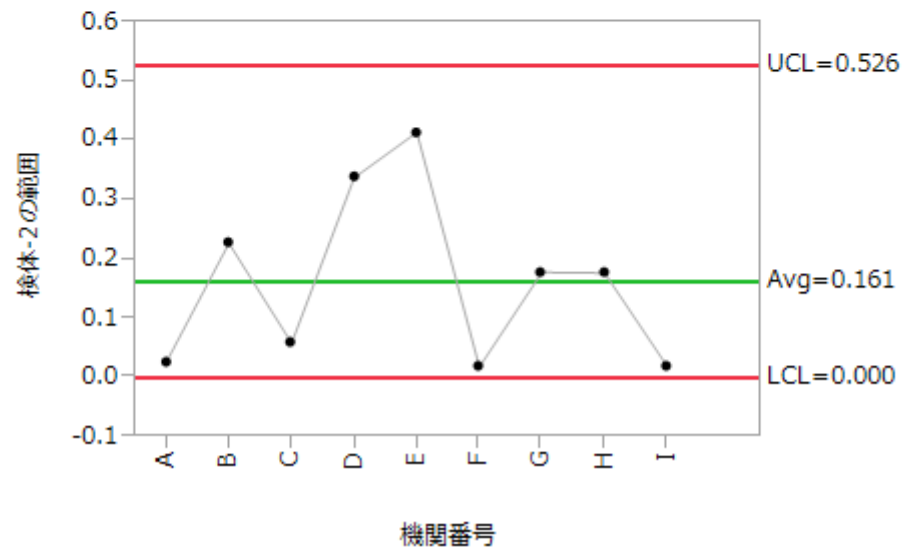
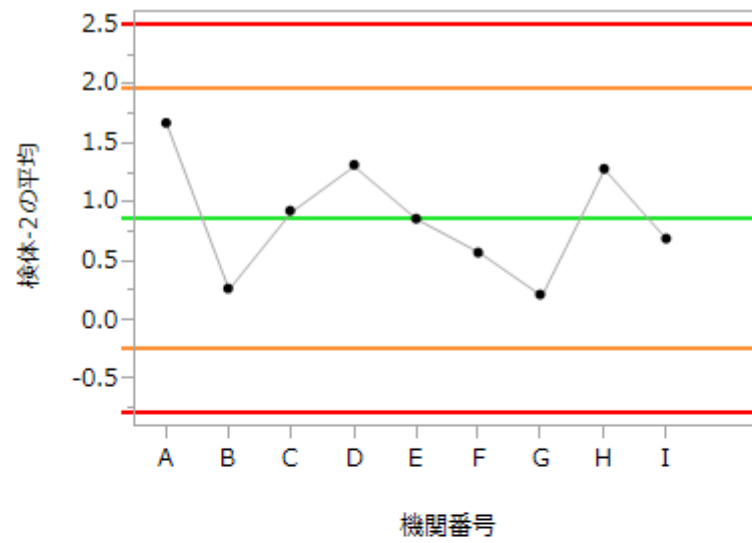


図 10 検体-2 における Xbar-R 管理図による評価（実測値）  
 Xbar 管理図における管理限界線は $|z\text{-スコア}|=2$ および $3$ とした。

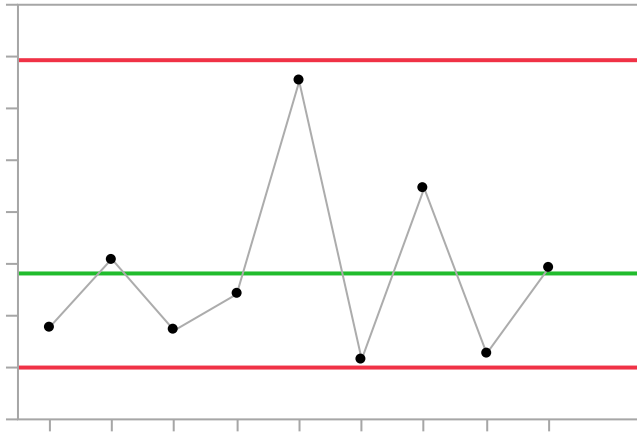
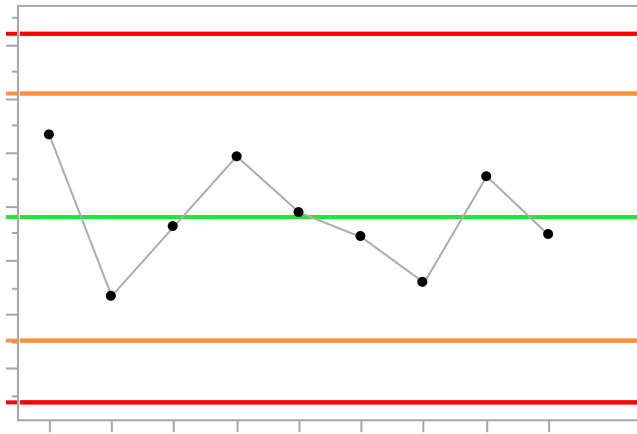


図 11 検体-4 における Xbar-R 管理図による評価 (実測値)  
 Xbar 管理図における管理限界線は  $|z\text{-スコア}|=2$  および  $3$  とした。

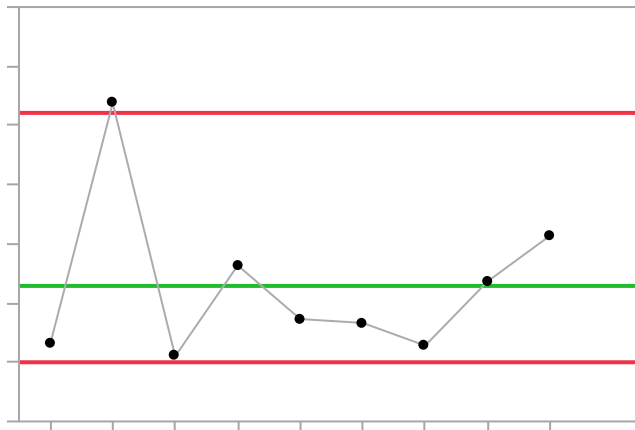
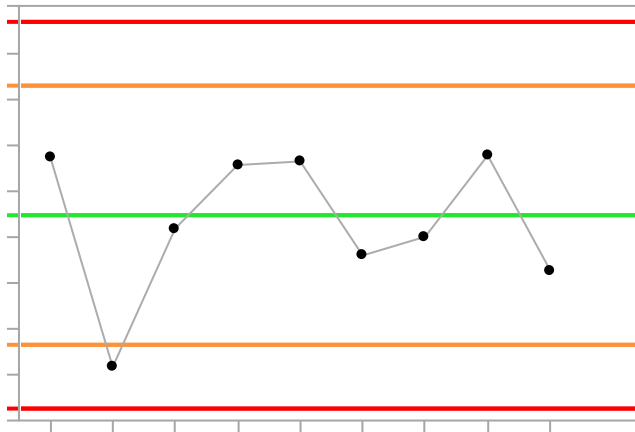


図 12 検体-5 における Xbar-R 管理図による評価 (実測値)  
 Xbar 管理図における管理限界線は  $|z\text{-スコア}|=2$  および  $3$  とした。

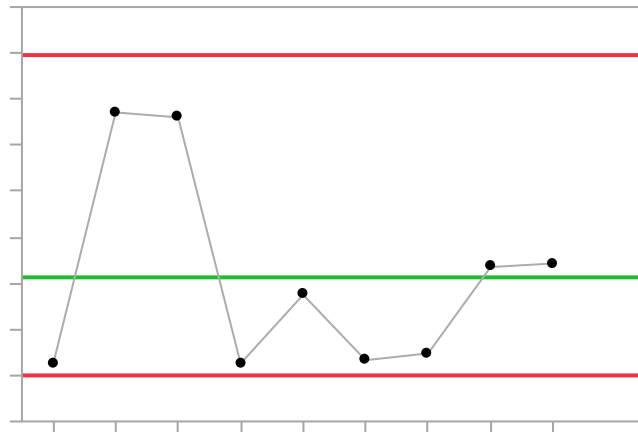
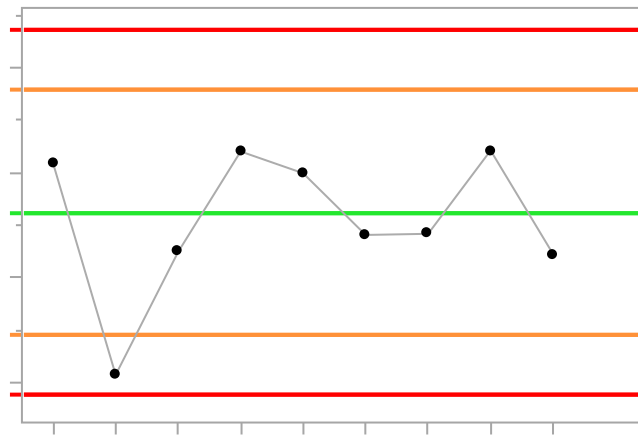


図 13 検体-6 における Xbar-R 管理図による評価 (実測値)  
 Xbar 管理図における管理限界線は $|z\text{-スコア}|=2$  および 3 とした。

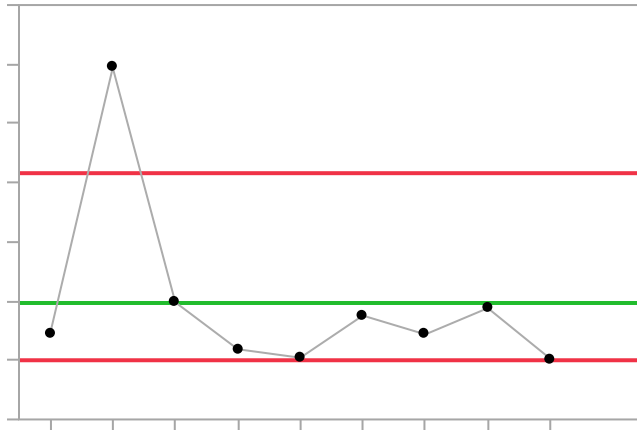
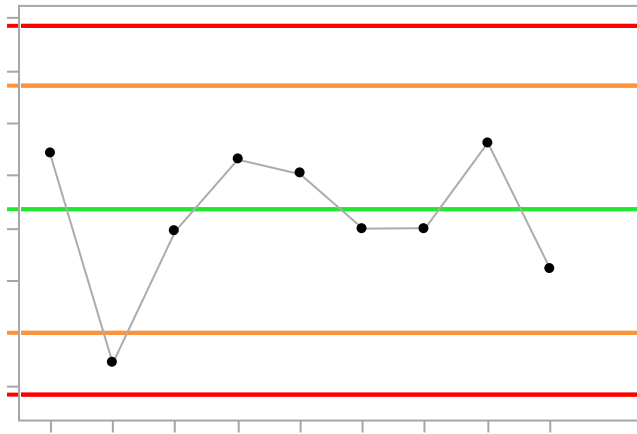


図 14 検体-7 における管理図による評価 (実測値)  
 Xbar 管理図における管理限界線は $|z\text{-スコア}|=2$  および  $3$  とした。

平成 30 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」  
研究分担報告

## 低温加熱によるウイルスの不活化

研究分担者 上間 匡 国立医薬品食品衛生研究所  
研究協力者 永田 文宏 国立医薬品食品衛生研究所

### 研究要旨

病原性ウイルスの低温加熱調理による低減効果について、ネコカリシウイルスよりも耐熱性のあるコクサッキーウイルス B 群 5 型 (CB5) (小菅ら、2016 年第 112 回日本食品衛生学会) とシカ肉等を用いて検討を行った。シカ肉およびイノシシ肉にウイルスを接種後、加熱調理し、CB5 感染価の測定および、遺伝子の定量を行った。その結果から、CB5 については、60°C30 分、55°C60 分以上の湯煎で、3log 以上の不活化が確認できたが、50°Cでは 90 分の加熱でもウイルスの不活化には不十分であることが示唆された。また、68°C5 分、65°C15 分の加熱により 75°C1 分と同等の、3log 以上の不活化が確認できた。

### A. 研究目的

近年、肉を柔らかく調理できる等のメリットから低温加熱調理が広く注目されているが、特にジビエ等では寄生虫やウイルスの汚染の可能性があり、安全性の確保が課題である。そこで我々は、病原性ウイルスの低温加熱調理による低減効果について、ネコカリシウイルスよりも耐熱性のあるコクサッキーウイルス B 群 5 型 (CB5) (小菅ら、2016 年第 112 回日本食品衛生学会) とシカ肉等を用いて検討を行った。

### B. 研究方法

食材には市販冷凍シカ肉(ロース)および、イノシシ肉(ロース、モモ)、摂取ウイルスとして CB5 を用いた。冷凍肉を冷

蔵庫内で解凍後カットして加熱調理まで 4°Cにて保存した。カットした重量は、試験①では、シカ肉(ロース) 49~122g、試験②では、シカ肉(ロース) 45~63g、イノシシ肉(ロース) 230~290g、イノシシ肉(モモ) 73~93g であった。加熱直前にウイルス 100 $\mu$ L (CB5、 $4.4 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub>/mL) をスパイクし、試験①では、フィルターバッグへ入れて 50、55、60°Cの湯煎にて 0、15、30、60、90 分間加熱した。試験②では、シカ肉(ロース)はオーブンにて加熱(中心温度 75°C1 分、68°C5 分、65°C15 分)、イノシシ肉(ロース)はロースト(中心温度 60°Cまでオーブン加熱後予熱調理し 68°C5 分)、イノシシ肉(モモ)はポワレ(フライパン加熱し中心温度 75°C1 分)した。試験①では、

加熱後ストマッカーで 60 秒以上処理し、ドリップ液を回収した。試験②では、フィルターバッグへ入れて細切後 BPW を加えストマッカー処理し、懸濁液の遠心上清を回収した。これらの回収した液を 0.45 $\mu$ m フィルターに通したものをウイルス液とし、CB5 感染価の測定および、遺伝子の定量を行った。

感染価の測定は、HEp-2 細胞を用いて 50% 感染終末点法で行い、遺伝子の定量は感染性推定遺伝子検査法（推定法）を用いて行った。推定法はウイルス液（70 $\mu$ L）を RNase で消化後（37 $^{\circ}$ C1 時間）、High Pure Viral RNA Kit（Roche）を用いて RNA 抽出後、Oligo（dT）プライマーを用いて逆転写反応を行い、リアルタイム PCR 法で定量した。

（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. 研究結果と考察

試験①の結果、60 $^{\circ}$ Cの湯煎によりシカ肉の中心温度が 60 度に到達するのに、100g の場合は 60 分、50g の場合は 30 分が必要であった。50g の場合、60 $^{\circ}$ C30 分の湯煎によっておよそ 3log のウイルス力価の低減が確認でき、試験管内での加熱によるウイルス力価の低減と同様の結果を得た。50g の場合、60 $^{\circ}$ C30 分、55 $^{\circ}$ C60 分以上の湯煎によってウイルス力価が 3～4log 程度低減した。50 $^{\circ}$ Cでは 90 分の加熱でもウイルス感染価の減少は 1log 未満であった。また、オープン加熱では、湯煎よりも中心温度が上昇するのに時間が

かかり、30 分加熱しても設定温度（65 $^{\circ}$ C）に到達しなかった。設定温度 200 $^{\circ}$ Cでも同様に、中心温度が上昇するのに時間がかかり、75 $^{\circ}$ Cに到達するのにおよそ 10 分を要した。試験②では、厚生労働省から示されている加熱条件である中心温度 75 $^{\circ}$ C 1 分以上と同等の条件を満たすために、シカ肉 50g の中心温度が 75 $^{\circ}$ C1 分、68 $^{\circ}$ C5 分、65 $^{\circ}$ C15 分となるようにオープン加熱し、感染価の測定を行ったところ、いずれも 3log 程度低減され検出限界以下となった。また、イノシシ肉 230g（ロース）をロースト（中心温度 60 $^{\circ}$ Cまでオープン加熱後、予熱調理し 68 $^{\circ}$ C5 分）した場合と、イノシシ肉 80g（モモ）をポワレ（フライパン加熱し 75 $^{\circ}$ C1 分）した場合についても、感染価は検出限界以下まで低減された。

これらの結果から、シカ肉の中心温度の上昇は、肉の重量が大きいほど時間がかかることが示された。60 $^{\circ}$ C30 分、55 $^{\circ}$ C60 分以上で、CB5 については、3log 以上の不活化が確認できたが、50 $^{\circ}$ Cでは 90 分の加熱でもウイルス感染価の減少は 1log 未満であり、ウイルスをほとんど不活化出来ないと考えられた。調理方法を変えた場合（フライパンやオープンを用いて焼くなど）や、約 80～230g 程度の重量を用いた場合について検討したところ、75 $^{\circ}$ C 1 分、68 $^{\circ}$ C5 分、65 $^{\circ}$ C15 分の加熱により 3log 以上の不活化が確認できた。今後、低温加熱（50、55、60 $^{\circ}$ C程度）での検討が必要である。また、今後の課題として、シカやイノシシ、ブタ肉の原材料汚染リスクとして E 型肝炎ウイルスや、調理従事者由来の汚染リスクとしてノロウイル

スそのものを用いた検討や、さらに、シカ肉やイノシシ肉といった野生獣肉における病原性ウイルスの汚染実態のデータが不足しており、定量 PCR 法などによる迅速な検証方法の確立が必要である。

#### E. 結論

CB5 については、60°C30 分、55°C60 分以上の湯煎で、3log 以上の不活化が確認できたが、50°Cでは 90 分の加熱でもウイルスの不活化には不十分であることが示唆された。また、68°C5 分、65°C15 分の加熱により 75°C1 分と同等の、3log 以上の不活化が確認できた。今後、さらに低温での検討が必要である。また、今後の課題として、シカやイノシシ、ブタ肉の原材料汚染リスクとして E 型肝炎ウイルスや、調理従事者由来の汚染リスクとしてノロウイルスそのものを用いた検討や、さらに、シカ肉やイノシシ肉といった野

生獣肉における病原性ウイルスの汚染実態のデータが不足しており、定量 PCR 法などによる迅速な検証方法の確立が必要である。

#### F. 研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表

永田 文宏、上間 匡：低温加熱によるシカ肉中のウイルス感染価の変化、第 114 回日本食品衛生学会学術講演会、2018 年、広島

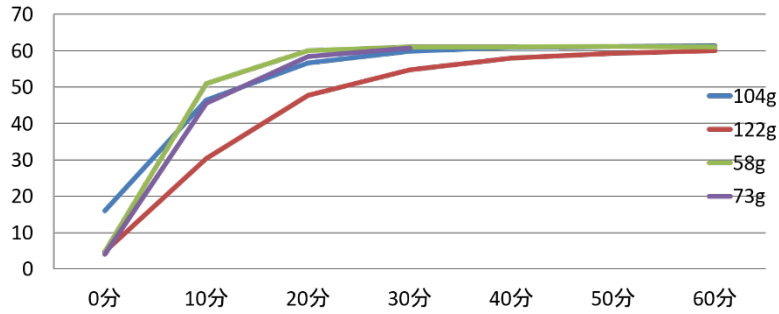
#### G. 健康危険情報

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

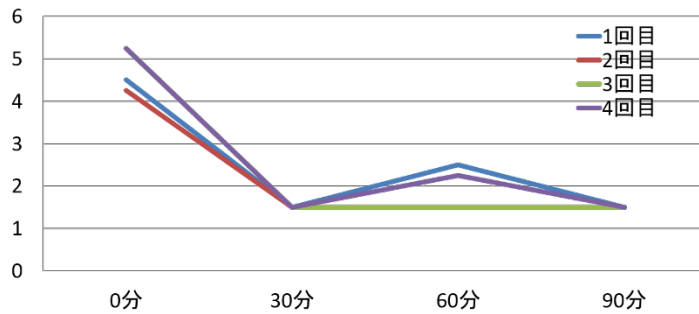
1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし





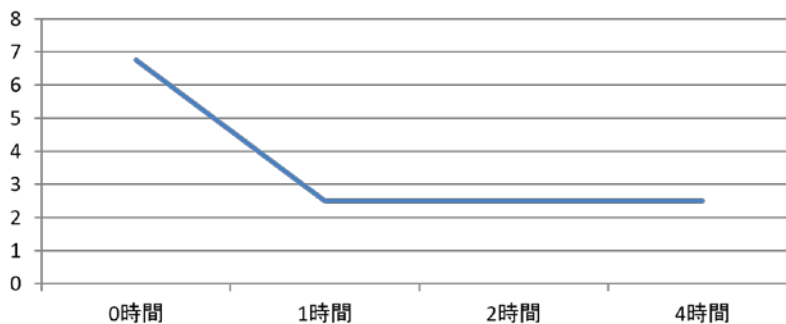
60°Cの湯煎によりシカ肉の中心温度が60度に到達するのに、100gの場合は60分、50gの場合は30分が必要であった。

図1. シカ肉の温度変化



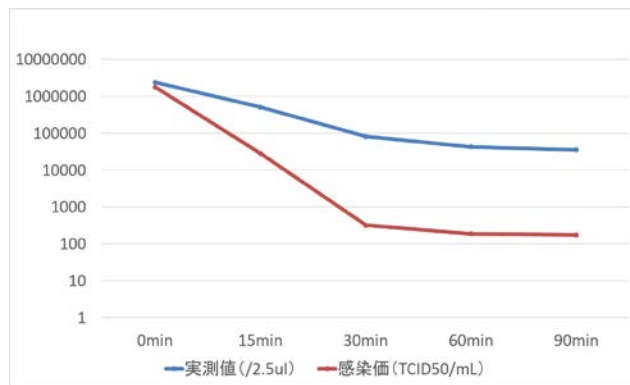
50gの場合、60°C30分の湯煎によっておよそ3logのウイルスカ価の低減が確認でき、図3の試験管内での加熱と同様の結果を得た。

図2. 60°C加熱による感染価変化(シカ肉50g)



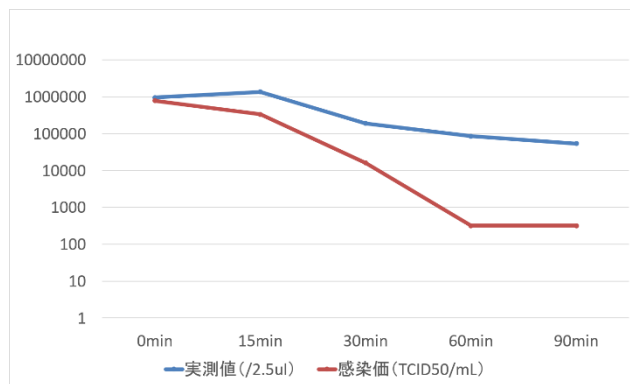
試験管内での60°C1時間の加熱によって、ウイルスカ価の低減が確認できた。

図3. 60°C加熱による感染価変化(試験管:n=2)



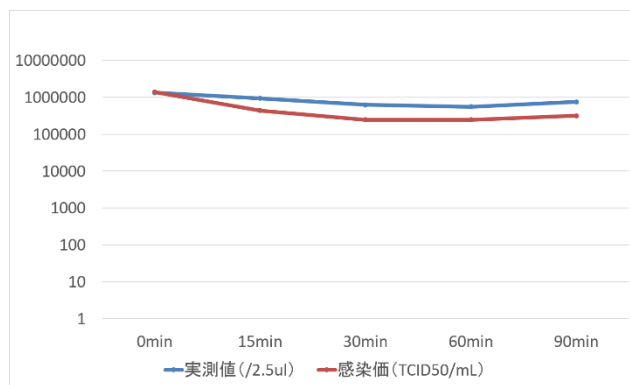
60°Cの場合、1.8log(15分)、3.8log(30分)、4.0log(60分)、4.0log(90分)の力価の低減が確認できた。

図4-1. 湯煎 60°C (n=2)



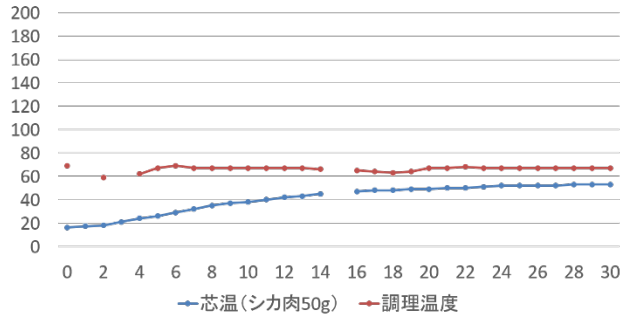
55度の場合、0.4log(15分)、1.7log(30分)、3.4log(60分)、3.4log(90分)の力価の低減が確認できた。

図4-2. 湯煎 55°C (n=2)



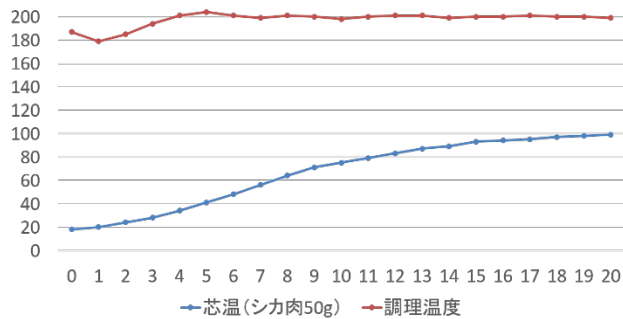
50度の場合、0.5log(15分)、0.8log(30分)、0.8log(60分)、0.6log(90分)の力価の低減が確認できた

図4-3. 湯煎 50°C (n=2)



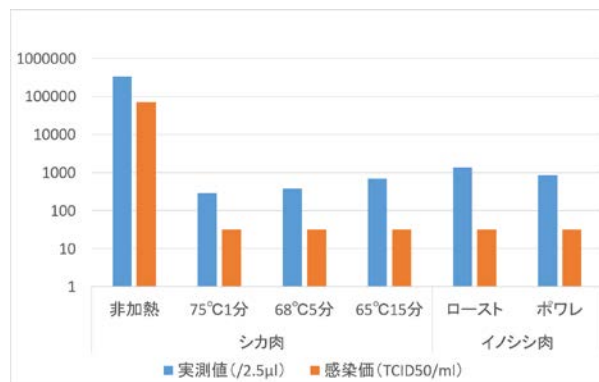
オープン加熱では、湯煎よりも中心温度が上昇するのに時間がかかり、30分加熱しても設定温度に到達しなかった。

図5-1. オープン 65°C



オープン加熱では、湯煎よりも中心温度が上昇するのに時間がかかり、30分加熱しても設定温度に到達しなかった。

図5-2. オープン 200°C



シカ肉50gの中心温度が75°C1分、68°C5分、65°C15分となるようにオープン加熱し、感染価の測定を行ったところ、いずれも3log程度低減され検出限界以下となった。また、イノシシ肉230g(ロース)をロースト(中心温度60°Cまでオープン加熱後、予熱調理し68°C5分)した場合と、イノシシ肉80g(モモ)をポワレ(フライパン加熱し75°C1分)した場合についても、感染価は検出限界以下まで低減された。

図6. オープン加熱によるウイルスの不活化(n=5)

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 30 年度 研究協力報告書

吉澄	志磨	清水	智美
筒井	理華	入谷	展弘
高橋	知子	三好	龍也
秋野	和華子	谷澤	由枝
植木	洋	藤井	慶樹
田村	務	小林	孝行
宗村	佳子		

平成 31 (2019) 年 3 月

平成 30 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

## 食中毒疑い事例のノロウイルス検査における 検出用プライマー内配列の一致状況の解釈に関する検討

研究協力者	吉澄 志磨	北海道立衛生研究所
	後藤 明子	北海道立衛生研究所
	大久保 和洋	北海道立衛生研究所
	石田 勢津子	北海道立衛生研究所
研究分担者	上間 匡	国立医薬品食品衛生研究所

### 研究要旨

北海道では、食中毒疑い事例の患者、調理従事者、食品等から検出されたノロウイルス遺伝子の塩基配列を比較し、一致するかどうかを確認している。比較には RT-PCR の検出用プライマー内の配列 (RdRp 領域:約 290 塩基、RdRp-VP1 領域:約 340 塩基) を用いているが、この領域の配列の一致・不一致の情報を感染源等の判断の裏付けとして使用することが妥当であるかを検証するため、この領域の比較結果がすべての検体で一致、またはほぼ一致した事例について、より長い配列(約 2,400 塩基; RdRp 領域:793 塩基、VP1 領域全長:約 1,630 塩基)での一致状況を確認した。その結果、対象事例の多くは RdRp-VP1 全長の比較でも検体間の配列が一致するという状況から大きくは逸脱していなかった。一方で、RdRp-VP1 全長の比較により、検出用プライマー内配列の比較では見えなかった不一致が多く検出された事例も一部確認された。このことから、感染源等の判断の裏付けとして検出用プライマー内配列の比較結果を使用することは妥当であるが、疫学調査の結果からは感染源や感染経路の特定が難しい事例等についてはより精度の高い裏付けが必要であり、RdRp-VP1 全長配列での一致状況の確認が有用であると考えられた。

### A. 研究目的

ノロウイルス (NoV) はヒトに急性胃腸炎を引き起こす代表的なウイルスであり、食中毒の病因物質として重要視されている。北海道における食中毒疑い事例の NoV 検査では、患者、調理従事者、食品等か

ら検出された NoV 遺伝子について塩基配列を決定し、その一致・不一致の情報を感染源推定などに対する科学的根拠として使用している。しかし、ここで比較しているのは NoV のゲノム全長約 7,600 塩基のうち、RT-PCR の検出用プライマー内

の配列であり、これは RdRp 領域の一部(約 290 塩基)と RdRp-VP1 領域の一部(約 340 塩基)の情報に過ぎない。また、検出用プライマー設定領域は、NoV ゲノム上で最も配列が保存されている領域である。そこで、この RT-PCR 検出用プライマー内配列における一致・不一致情報の科学的根拠としての妥当性を検証するため、NoV 検出用プライマー内の配列がすべての検体で一致した事例と 1 塩基違いの検体がみられた事例を対象に、より長い配列での一致・不一致状況を確認し、検出用プライマー内配列での解析結果と比較した。

## B. 研究方法

### 1. 材料

2014～2018 年に NoV 検査を実施した集団胃腸炎事例のうち、NoV 検出用プライマー内の配列がすべての検体で一致した食中毒事例から 5 事例 (NoV 陽性糞便 53 検体)、1 塩基違いの検体がみられた食中毒・感染症・感染経路不明事例から 4 事例 (NoV 陽性糞便 50 検体) を今回の調査対象として選択した。検出された NoV の遺伝子型は、配列一致の 5 事例では GII. Pe\_GII. 4 Sydney 2012 が 2 事例、GII. P17\_GII. 17 が 2 事例、GII. P16\_GII. 2 が 1 事例、1 塩基違いの検体がみられた 4 事例では GII. P2\_GII. 2, GII. P16\_GII. 2, GII. P12\_GII. 3, GII. Pe\_GII. 4 Sydney 2012 がそれぞれ 1 事例であった。

### 2. 方法

NoV 陽性の 103 検体について、10%便乳剤から RNA を抽出し、ORF3 の VP2 領域に設定したプライマーを用いて cDNA を合成した。これを鋳型として、RdRp 領域に

設定された NV82 改変プライマー(1st)および P1 改変プライマー(nested)と、VP2 領域に設定した 2 種類のプライマーを用いて Nested PCR を行った。Nested PCR の増幅産物について、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定した。今回の検討に使用する塩基配列は、P1 改変プライマーより下流の RdRp 領域から VP1 領域全長 (以下、RdRp-VP1 全長) の 2,396 塩基 (GII. 4, GII. 17) 、 2,402 塩基 (GII. 2)、2,420 塩基 (GII. 3) とした。

事例内で RdRp-VP1 全長配列を比較した際に不一致がみられた検体については、増幅過程でのエラーを考慮して再度 RNA 抽出からシーケンスまでを行い、不一致の再現を確認した上で結果を示した。

(倫理面への配慮)

本研究については、北海道立衛生研究所倫理審査委員会の審査を受け、承認を得た。

## C. 研究結果

調査対象の 103 検体すべてについて、RdRp-VP1 全長の塩基配列情報を得ることができた。それぞれの事例内で検体間の配列を比較し、その結果を表 1 に示した。また、発症から糞便採取までの日数を表 2 に、塩基配列の不一致箇所の詳細を図 1 に示した。

### (1) 配列一致事例の検証

事例 No. 1～5 の 5 事例は、調理施設従業員 (調理従事者および配膳係などの従業員) および患者から検出された NoV の検出プライマー内配列がすべて一致した事例である。このうち 3 事例 (事例 No. 3,

4, 5) は RdRp-VP1 全長で比較してもすべての検体で塩基配列が一致したが、2 事例 (事例 No. 1, 2) では配列の不一致が確認された。

事例 No. 1 は弁当による食中毒事例で、患者 13 検体のうち 3 検体 (A, B, C) で 1 塩基の不一致が確認されたが、この 3 検体はすべて別団体の患者であった。採便はそれぞれ発症から 1 日後、5 日後、2 日後であった。不一致は VP1 領域のそれぞれ異なる位置にみられ、すべて C→T (同義置換) であった。

事例 No. 2 は、飲食店における 3 日間の利用団体から発症者が確認された事例である。RdRp-VP1 全長の比較により、患者 7 検体で不一致がみられた。不一致検体はすべて発症から 3 日以内の採便であった。不一致 7 検体のうち、1 塩基違いが 6 検体、2 塩基違いが 1 検体であったが、1 塩基違いのうちの 4 検体は同じ位置 (VP1 領域の 462 番目の塩基) での同じ内容 (T→T/C または C、同義置換) の不一致であった。残り 2 検体の不一致も VP1 領域に位置し、それぞれ G→G/T、T→T/C (どちらも非同義置換) であった。2 塩基の不一致がみられた 1 検体は、VP1 領域での T→C および A→G の不一致であり、どちらも同義置換であった。

#### (2) 1 塩基違いがみられた事例の検証

事例 No. 6~9 の 4 事例は、検出用プライマー内配列の比較で 1 塩基違いの検体が確認された事例である。

事例 No. 6 はホテル宿泊の複数団体から発症者が確認された事例で、食中毒と断定された。検出用プライマー内配列の比較により患者 1 検体で 1 塩基の不一致が

確認されていたが、RdRp-VP1 全長の比較でもそれ以上の不一致は確認されなかった。一方で、検出用プライマー内配列の比較では他と一致していた検体のうち、RdRp-VP1 全長の比較により調理従事者 1 検体と配膳担当の従業員 2 検体で 1 塩基の不一致が確認された。採便時期は、患者は発症から 2 日後、従業員 A (事前発症者) は 6 日後で、調理従事者と従業員 B は発症していなかった。不一致の位置は、患者は検出用プライマーの COG2F/G2-SKR 増幅領域で A→G (非同義置換)、調理従事者は VP1 領域で T→C (同義置換) であり、従業員 A, B は同じ位置 (RdRp 増幅領域の 535 番目の塩基) での同じ内容 (C→C/T または T、同義置換) の不一致であった。

事例 No. 7 は、発症団体に偏りがあるなどの疫学調査の結果から食中毒とは断定されなかった事例である。検出用プライマー内配列の比較により 1 塩基の不一致が患者 2 検体 (A, B) で確認されていたが、RdRp-VP1 全長の比較でもそれ以上の不一致は確認されなかった。また、RdRp-VP1 全長の比較により、さらに患者 1 検体 (C) で 1 塩基の不一致が確認された。採便時期は、患者 A, B が発症から 2 日後、患者 C が 6 日後であった。不一致の位置はそれぞれ、検出用プライマーの P1/P3 増幅領域で T→C (同義置換)、COG2F/G2-SKR 増幅領域で T→A (非同義置換) と、VP1 領域で C→T (同義置換) であった。

事例 No. 8 は、他団体に有症苦情がないなどの疫学調査の結果から、感染経路は食事以外と判断された事例である。NoV 陽性の調理施設従業員 5 名は患者と同じ時期に発症していた。検出用プライマー

内配列の比較により 1 塩基の不一致が患者 2 検体 (A, B) で確認されていたが、RdRp-VP1 全長で比較したところ、A は 2 塩基、B は 3 塩基の不一致となった。また、RdRp-VP1 全長の比較により、さらに患者 1 検体 (C) で 1 塩基の不一致が確認された。採便時期は、患者 A が発症から 3 日後、B が 6 日後、C が 3 日後であった。不一致の位置は、患者 A が P1/P3 増幅領域の A→C と VP1 領域の G→C (どちらも非同義置換)、患者 B が P1/P3 増幅領域の C→T (同義置換) と VP1 領域の T→T/C および A→A/G (どちらも非同義置換)、患者 C が VP1 領域で C→T (非同義置換) であった。

事例 No. 9 は保育園で発生し、感染症事例と判断された。検出用プライマー内配列の比較により患者 1 検体 (A) で 1 塩基の不一致が確認されていたが、RdRp-VP1 全長の比較では 11 塩基の不一致となった。また、RdRp-VP1 全長の比較により、さらに患者 1 検体 (B) で 1 塩基の不一致が確認された。採便時期は、患者 A は発症から 2 日後、患者 B は 1 日後であった。不一致の位置は、患者 A は検出用プライマーの P1/P3 増幅領域での T→C (非同義置換) と、RdRp 領域の 2 箇所 (A→G と G→A、どちらも同義置換)、VP1 領域の 8 箇所 (T→C、C→T、A→G、G→T、C→T、C→A、T→C、C→T; 2, 5, 8 番目は同義置換) であり、患者 B は VP1 領域での A→G (非同義置換) であった。

#### D. 考察

(1) 不一致検体および不一致塩基数の増加の有無

検出用プライマー内配列が全検体で一

致していた食中毒 5 事例について RdRp-VP1 全長の配列を比較したところ、3 事例 (事例 No. 3, 4, 5) は全検体で一致、事例 No. 1 は 1 塩基違いが 3 検体であり、これらは RdRp-VP1 全長の比較でも一致またはほぼ一致したが、事例 No. 2 は 1 塩基違いが 6 検体および 2 塩基違いが 1 検体と、検出用プライマー内配列の比較では見えなかった不一致が多く検出された。

検出用プライマー内配列の比較で 1 塩基違いの検体がみられた 4 事例について RdRp-VP1 全長配列の比較を行ったところ、すべての事例でさらに不一致検体が確認されたが、1 塩基違い 1 検体が 3 事例、1 塩基違い 3 検体が 1 事例であり、検出用プライマー内配列での比較結果と大きな差はみられなかった。一方、検出用プライマー内配列の比較により 1 塩基の不一致が確認されていた 6 検体では、3 検体は RdRp-VP1 全長配列で比較してもそれ以上の不一致は確認されなかったが、3 検体では不一致数がそれぞれ 2 塩基、3 塩基、11 塩基に増加した。11 塩基の不一致がみられた検体は発症の 2 日後に採便されており、少なくともこの検体は事例内の他の検体のものとは異なるウイルス株 (別ルートからの感染) と判断された。

#### (2) 同位置同変異についての解釈

事例 No. 2 と No. 6 は、RdRp-VP1 全長配列の比較により、複数検体で同じ位置に同じ内容の不一致が確認された。図 1 に示すように、事例内の比較で不一致がみられる位置は不規則であり、感染後の変異が複数の検体で同じ位置に入る確率は低いと考えられる。そのため、同一事例内の複数検体で同じ位置に同じ内容の不



一致がみられた場合は、感染源のウイルスが単一ではなかった（配列が異なるウイルスが混在していた）可能性が高い。

事例 No. 2 は、患者 4 検体で同じ位置に同じ内容の不一致が確認され、また発症の翌日に採便した検体で 2 塩基の不一致がみられていた。ウイルスが単一ではない感染源として二枚貝があげられるが、この事例では複数の団体から発症者が確認されており、カキフライが一部団体に提供されていた。しかし、カキフライの喫食のない患者においても NoV が検出され、また、同じ位置に同じ内容の不一致がみられた 4 検体にもカキフライの喫食のない患者が含まれていることから、これが共通の原因とは考えられなかった。ウイルスが単一ではない感染源または汚染源としては、二枚貝の他に、配列違いの NoV が混在している糞便、複数名の NoV 感染者により糞便汚染されたトイレ、二枚貝の中腸腺やパックの海水により二次汚染された食品などが考えられるが、この事例の原因については不明である。

事例 No. 6 では、従業員の 2 検体 (A, B) で同じ位置に同じ内容の不一致が確認された。従業員 A は事前発症者で、B は発症していない。不一致は、この 2 検体以外の調理施設従業員（発症なし）5 検体を含む他の検体で C のところが、従業員 A では C/T、従業員 B では T であった。この結果から、従業員 A の糞便が従業員 B の感染源であったか、あるいは従業員 A, B の感染源が共通で、その感染源のウイルスの配列が C/T 混在であったなどが考えられたが、感染後の塩基置換の可能性もあるため当時のウイルスの配列が数日後の

検便の結果と同じとは限らず、感染源の推測は困難であった。一方、患者 9 検体はすべてこの位置の配列が C であることから、患者の感染源のウイルスはこの位置が C であったと推測された。

以上のように、NoV 検出用プライマー内の配列が事例内のすべての検体で一致またはほぼ一致した事例の多くは、RdRp-VP1 全長の比較でも「一致する」という状況から大きくは逸脱していなかったが、一部、検出用プライマー内配列の比較では見えなかった不一致が多く検出された事例もあった。このことから、感染源等の判断の裏付けとして検出用プライマー内配列の比較結果を使用することは妥当であるが、疫学調査の結果からは感染源や感染経路の特定が難しい事例等についてはより精度の高い裏付けが必要であり、RdRp-VP1 全長配列での一致状況の確認が選択肢の一つになると考えられた。

RdRp-VP1 全長配列での比較結果は、食中毒疑い事例においてより精度の高い裏付けとなる。例えば、同じ遺伝子型の異なるウイルス株は、検出用プライマー内配列の比較では判別できない場合でも RdRp-VP1 全長配列では判別可能と考えられることから、原因と疑われる調理従事者に患者と 1 塩基の不一致がみられた場合や、二枚貝喫食など感染源のウイルスが単一ではない可能性がある事例では、RdRp-VP1 全長配列での一致状況の確認が有用である。しかし、何塩基の不一致から別のウイルス株といえるかの判断基準が定められていないことから、実施によ

り、むしろ判断に困るケースも出てくると考えられる。判断基準の設定のため、今後は事例間の配列の比較や塩基置換とその蓄積にかかる日数についてのモニタリング調査などを行い、情報の集積および分析を続ける必要がある。

## E. 結論

NoV 検出用プライマー内配列がすべての検体で一致していた事例の多くは、より長い配列の RdRp-VP1 全長の比較でも「一致する」という状況から大きくは逸脱していなかった。一方で、RdRp-VP1 全長の比較により、検出用プライマー内配列の比較では見えなかった不一致が多く検出される事例もあった。このことから、感染源等の判断の裏付けとして検出用プ

ライマー内配列の比較結果を使用することは妥当であるが、疫学調査の結果からは感染源や感染経路の特定が難しい事例等にはより精度の高い裏付けが必要であり、RdRp-VP1 全長配列での一致状況の確認が有用であると考えられた。

## 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

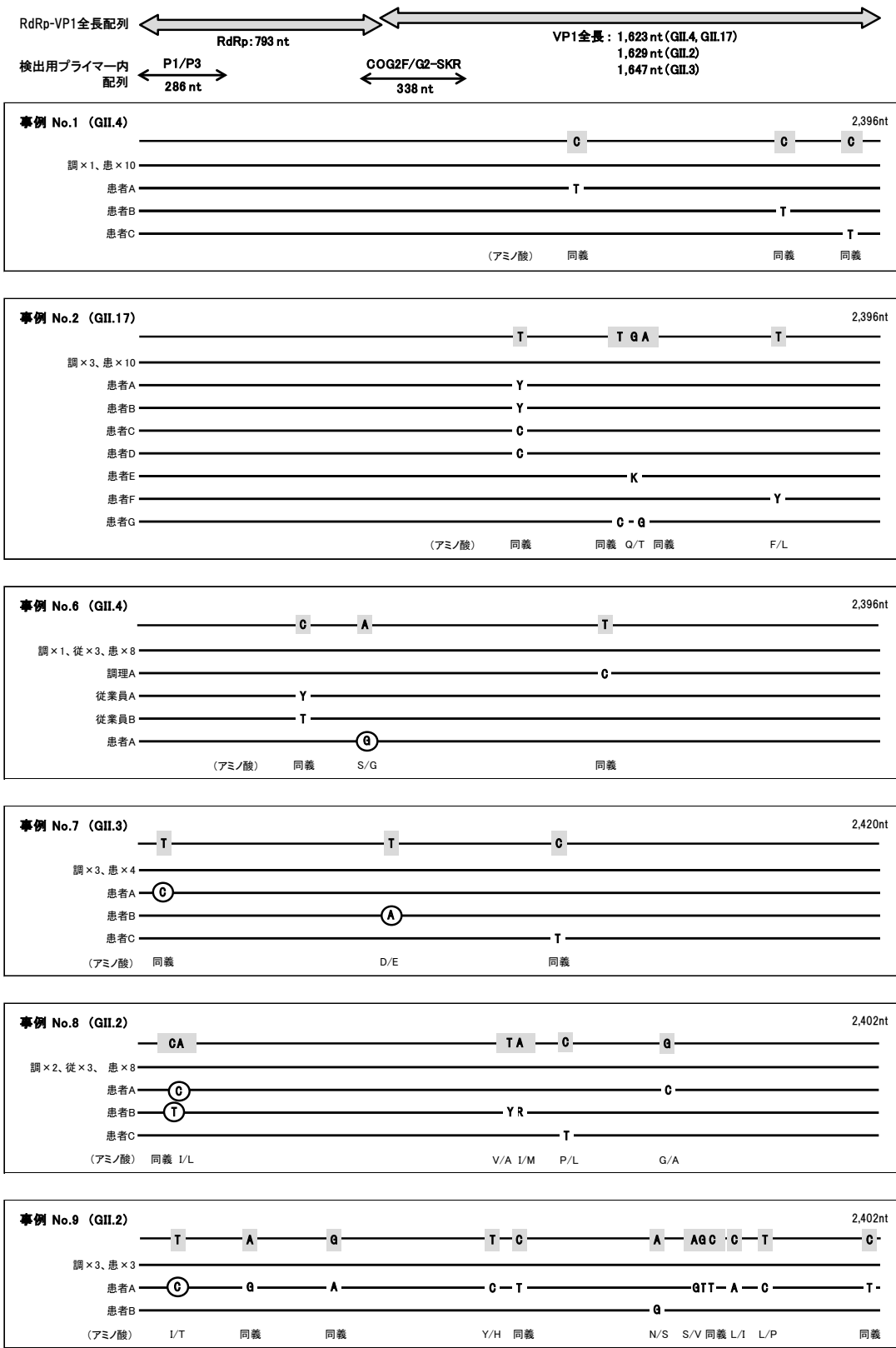
表1 各事例における塩基配列の一致・不一致状況

事例No.	感染様式	発生年/月	原因・発生施設	検出遺伝子型	塩基配列を比較した検体数			患者	検出用プライマー内 不一致数(検体)	RdRp-VP1全長 不一致数(検体)
					調理従事者 / 従業員(配膳等)					
					事前発症	事後発症	症状なし			
1	食中毒	2017/12	飲食店	GILPe_GIL4	-	-	1 / 0	13	すべて一致	1塩基(患者A) 1塩基(患者B) 1塩基(患者C)
2	食中毒	2018/3	飲食店	GILP17_GIL17	-	-	3 / 0	17	すべて一致	1塩基(患者A) 1塩基(患者B) 1塩基(患者C) 1塩基(患者D) 1塩基(患者E) 1塩基(患者F) 2塩基(患者G)
3	食中毒	2018/5	飲食店	GILP17_GIL17	-	-	2 / 0	10	すべて一致	すべて一致
4	食中毒	2018/5	事業所	GILPe_GIL4	1 / 0	-	-	2	すべて一致	すべて一致
5	食中毒	2018/6	飲食店(旅館)	GILP16_GIL2	1 / 1	-	-	2	すべて一致	すべて一致
6	食中毒	2014/3	旅館	GILPe_GIL4	0 / 1	-	2 / 4	9	1塩基(患者A) →	1塩基(患者A) 1塩基(調理A/症状なし) 1塩基(従業員A/事前発症) 1塩基(従業員B/症状なし)
7	不明	2015/1	旅館	GILP12_GIL3	-	2 / 0	1 / 0	7	1塩基(患者A) → 1塩基(患者B) →	1塩基(患者A) 1塩基(患者B) 1塩基(患者C)
8	感染症	2016/1	旅館	GILP2_GIL2	-	2 / 3	-	11	1塩基(患者A) → 1塩基(患者B) →	1塩基(患者A) → 2塩基(患者A) 3塩基(患者B) 1塩基(患者C)
9	感染症	2018/7	保育園	GILP16_GIL2	-	2 / 0	1 / 0	5	1塩基(患者A) →	11塩基(患者A) 1塩基(患者B)

表2 発症から糞便採取までの日数

事例No.	感染様式	糞便採取時期 <sup>※</sup> 別検体数 (従業員の数は○囲み)																			
		事例内でRdRp-VP1全長配列が一致した検体										RdRp-VP1全長配列で「不一致」がみられた検体									
		当日	1日	2日	3日	4日	5日	6日	7日	8日	従業員発症なし	1塩基			2塩基		3塩基	11塩基			
1	食中毒		4	5	1						①	1	1		1						
2	食中毒		2	4	4						③	2	3	1				1			
3	食中毒		2	8							②										
4	食中毒			1		1					①										
5	食中毒			2	①	①															
6	食中毒	1		5	1		1				④	1				①	②				
7	不明		1	2	①	①			1		①	2			1						
8	感染症			①	④	④		2	1				1					1	1		
9	感染症	①	①	1							①	1									1

※発症から採便までの日数



○: 検出用プライマー内配列の比較で検出される不一致

図1 塩基配列の不一致がみられた事例についての比較結果の詳細

平成 30 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

青森県における集団胃腸炎事例から検出されたノロウイルスの  
分子疫学解析 (2012/13～2017/18 シーズン)

研究協力者	福田 理	青森県環境保健センター
研究協力者	筒井 理華	青森県環境保健センター
研究分担者	上間 匡	国立医薬品食品衛生研究所

### 研究要旨

2012年9月～2018年8月(2012/13～2017/18 シーズン)に青森県内で発生した集団胃腸炎事例のうち、調理従事者からノロウイルスが検出された食中毒15事例の遺伝子解析を行った。2017/18 シーズンに発生した事例番号15では、発症者便由来の GII.4 Sydney\_2012 のうち1株が、調理従事者便由来株と1塩基異なっていた。このことから、同一発症者集団においては1塩基の置換は起こり得ることが示唆された。

#### A. 研究目的

ノロウイルス(Norovirus、以下 NoV)は、冬季の胃腸炎や食中毒の原因ウイルスの1つとして知られている。過去のノロウイルス食中毒の調査結果から、ウイルスに感染した調理従事者等を介して食品が汚染されたことが原因となっているケースが多く、食品から直接ウイルスを検出することは難しいため、食中毒事例のうち約70%で原因食品が特定できていない<sup>1)</sup>。

近年、調理従事者が関与する食中毒事例が増加傾向にあるとされており<sup>1)</sup>、このような事例では、調理従事者と発症者から同一の病原体が検出されることは、感染源や感染経路を明らかにする上で、有力な手がかりとなる。一方、発症者と調

理従事者等から検出された NoV のシーケンス解析の結果、同じ遺伝子型が検出される場合、多くの事例では塩基配列が一致するが、一部の事例で塩基配列が1塩基異なる事例が認められる場合がある。

今回、2012/13～2017/18 シーズンに青森県内で発生した NoV による集団胃腸炎事例のうち、調理従事者から NoV が検出された食中毒事例について、分子疫学的に検討したので報告する。

#### B. 研究方法

##### 1. 材料

2012/13～2017/18 シーズンに青森県内で発生した集団胃腸炎事例のうち、調理従事者から NoV が検出された食中毒15事例573検体(ふん便370、吐物9、拭取り

166、食品 28) を用いた (表 1)。

なお、感染地が県外であると推定される事例は除いた。

## 2. ウイルス RNA の抽出・cDNA 合成・NoV 遺伝子の検出 (リアルタイム PCR 及び nested PCR)

「ノロウイルスの検出法について」(平成 15 年 11 月 5 日付食安監発第 1105001 号) に準じて行った。

## 3. 遺伝子解析

nested PCR 産物を QIAquick PCR Purification Kit で精製し、BigDye Terminator Kit (ABI PRISM) で BigDye 反応後、DNA ダイレクトシーケンサー ABI PRISM310 (Applied Biosystems)、Applied Biosystems® 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用い遺伝子解析を行った。DNA ダイレクトシーケンス解析法により NoV Capsid 領域の塩基配列を決定し (GI : 260nt、GII : 279nt)、得られた塩基配列を塩基配列解析ソフトウェア Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) version6<sup>2)</sup> を用い、Kimura 2-parameter model を用いた ML (Maximum-Likelihood) 法で系統樹を作成した。系統樹の信頼性の評価には bootstrap 法 (反復回数 1000) を用いた。標準株は文献<sup>3)</sup>に記載の株を使用した。

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

2012/13~2017/18 シーズンに青森県内で発生し、調理従事者から NoV が検出された食中毒 15 事例の概要を表 1 に示した。

行政的には、15 事例全て NoV GII による食中毒と判断された。全 15 事例について、調理従事者、発症者及び非発症者等便 (陽性数/検体数 : 232/370)、吐物 (3/9)、拭取り (6/166) から NoV 遺伝子が検出されたが、食品 (0/28) からは検出されなかった。遺伝子群別で見ると、事例番号 2 は GI 及び GII の両方が検出され、それ以外の 14 事例は GII のみが検出された。

全 15 事例について NoV 陽性検体の遺伝子解析を行い、その内訳を表 2 に示した。GI は 260nt、GII は 279nt の領域について、事例ごとに同じ遺伝子型の調理従事者便由来株と調理従事者便以外に由来する株の塩基配列を比較した。

事例番号 1 から 14 までについての塩基配列の比較結果等は、平成 29 年度までに報告しているとおりである。

2017/18 シーズンに発生した事例番号 15 においては、NoV GII. 2 が 3 株、GII. 4 が 22 株、GII. 17 が 2 株、遺伝子型不明の GII が 3 株検出された。

これらのうち、GII. 4 について、発症者便由来の 1 株 (②) が、調理従事者便由来の 1 株、発症者便由来の 19 株及び吐物由来の 1 株 (①) と 1 塩基異なっており (G159A)、相同性は 99.6%であったが、①と②の間でアミノ酸置換は見られなかった。

なお、GII. 2 については、発症者便のみからの検出であったが、3 株のうち 1 株 (②) が他の 2 株 (①) と 4 塩基異なっており (T66C、C123T、C126T、A207T)、相同性は 98.6%であった。これについても、①と②の間でアミノ酸置換は見られなかった。

全 15 事例について、ML 法による系統樹を図 1 (GI)、図 2 (GII) に示した。図 1 については、2017/18 シーズンにおいて NoV GI を原因とする対象事例が無かったため、平成 29 年度に報告したものと同一の図である。配列名には、事例番号、遺伝子型の他に、調理従事者便・発症者等便・吐物・拭取りの塩基配列が一致した株数を記載した。

系統樹解析の結果、事例番号 1、2、3、5、6、7、10、11 及び 15 で検出された GII. 4 は、すべて Sydney\_2012 と同じクラスターに分類された。また、事例番号 4、8、9、12 及び 15 から検出された GII. 17 は、2014 年以降の川崎類似株であったが、事例番号 5 から検出された GII. 17 は、それ以前に検出されていた別系統のものであった。

#### D. 考察

今回新たに対象とした事例番号 15 は、行政的には「NoV GII を原因とする食中毒」と判断されているが、原因となった NoV GII は、複数の遺伝子型 (GII. 2、GII. 4、GII. 17) が含まれていた。

これらのうち、調理従事者便から検出された GII. 4 については、多くの発症者便由来株と塩基配列が一致しており、感染源及び感染経路の推定並びに食中毒断定に資するデータとなった。

一方で、同一発症者集団から 1 塩基異なる株も検出されており、当該発症者は他の発症者と同じ食品を喫食して感染していると考えられることから、同一の感染源及び感染経路による NoV GII. 4 の感染例においても、Capsid 領域においては、1 塩基の置換は起こり得ることが示唆さ

れた。

しかしながら、何塩基程度までの置換であれば、疫学的関連性があると言えるのかといった結論には至らなかったことから、引き続き解析データの蓄積を行うとともに、より広い領域まで解析し、比較検討を行う必要があると考える。

#### E. 結論

1. 調理従事者から NoV が検出された食中毒事例は 15 事例であった。
2. 11 事例 (事例番号 2、8、12 及び 15 を除く) の調理従事者由来株と発症者等由来株の塩基配列の相同性は 100%であった。
3. 2017/18 シーズンに発生した事例番号 15 では、発症者便由来の 1 株が調理従事者便由来株と 1 塩基異なっていた。

#### 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

#### 文献

- 1) 厚生労働省：ノロウイルスに関する Q & A (最終改定:平成 30 年 5 月 31 日).
- 2) Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A. & Kumar, S. (2013).

MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30, 2725-2729.

3) 片山和彦：ノロウィークウイルス（ノロウイルス）の遺伝子型（2015年改訂

版）。病原微生物検出情報，  
(<http://www.nih.go.jp/niid/ja/norovirus-m/norovirus-iasrs/5913-pr4274.html>)

表1 青森県内における調理従事者から NoV が検出された食中毒事例 (2012/13～2017/18 シーズン)

シーズン	事例番号	発生日	原因施設	摂食場所	遺伝子群	遺伝子型	ふん便				吐物		拭取り		食品			
							調理従事者		発症者ほか		陽性数	検査数	陽性数	検査数	陽性数	検査数	陽性数	検査数
							陽性数	検査数	陽性数	検査数								
2012/13	1	H25.1.18	飲食店	飲食店	NoV GII	GII.4	2	7	8	8			0	10				
	2	H25.1.24	飲食店	飲食店	NoV GI NoV GII	GI.6、GI.7、GI.9 GII.2、GII.4	3	7	10	11			0	13				
	3	H25.3.25	ホテル	ホテル	NoV GII	GII.4	1	4	12	12			0	14	0	6		
	4	H25.4.11	飲食店	事業所	NoV GII	GII.17	2	2	3	3			0	10				
2013/14	5	H25.12.14	ホテル	ホテル	NoV GII	GII.4、GII.17	3	28	22	25			4	17				
	6	H26.1.15	飲食店	事業所	NoV GII	GII.4	1	6	25	26	1	5	1	13				
	7	H26.5.13	給食施設	給食施設	NoV GII	GII.4	3	9	4	4			0	5	0	7		
2014/15	8	H26.12.31	飲食店	家庭	NoV GII	GII.17	2	3	18	21	1	1	0	13				
	9	H27.2.9	飲食店	学校	NoV GII	GII.13、GII.17	3	16	13	14			0	6				
	10	H27.2.12	給食施設	給食施設	NoV GII	GII.4	3	4	7	7			0	6	0	9		
2015/16	11	H28.2.6	飲食店	飲食店	NoV GII	GII.4	1	2	6	6			0	11				
	12	H28.3.19	飲食店	飲食店	NoV GII	GII.17	4	13	19	30			0	5	0	1		
2016/17	13	H28.12.10	飲食店	飲食店	NoV GII	GII NT、GII.2	1	6	20	30			1	13				
	14	H28.12.19	飲食店	飲食店	NoV GII	GII.2	1	22	6	6			0	19	0	4		
2017/18	15	H30.4.9	飲食店	事業所他	NoV GII	GII NT、GII.2、 GII.4、GII.17	2	7	27	31	1	3	0	11	0	1		
計							32	136	200	234	3	9	6	166	0	28		



表 2 食中毒事例において検出された NoV 遺伝子型の内訳

シーズン	事例番号	発生日	遺伝子型	ふん便		吐物	拭取り	相同性
				調理従事者	発症者ほか			
2012/13	1	H25.1.18	GII NT		1			-
			GII.4 Sydney_2012	2	7			100%
	2	H25.1.24	GII.6 ①	1				97.3%
			GII.6 ②		1			
			GII.7	1				-
			GII.9		1			-
			GII NT		2			-
3	H25.3.25	GII.2	1				-	
		GII.4 Sydney_2012 ①	1	5			99.6%	
			GII.4 Sydney_2012 ②		1			
4	H25.4.11	GII.4 Sydney_2012	1	12			100%	
2013/14	5	H25.12.14	GII.17	2	3			100%
			GII.4 Sydney_2012	2	22		4	100%
	6	H26.1.15	GII.17	1				-
			GII.4 Sydney_2012	1	25	1	1	100%
7	H26.5.15	GII NT		1			-	
		GII.4 Sydney_2012	3	3			100%	
2014/15	8	H26.12.31	GII.17 ①	2	14	1		99.6%
			GII.17 ②		4			
	9	H27.2.9	GII.13	2	13			100%
2015/16	10	H27.2.12	GII.17	1				-
			GII.4 Sydney_2012	3	7			100%
	11	H28.2.6	GII.4 Sydney_2012	1	6			100%
			GII.17 ①	4	17			99.6%
			GII.17 ②		1			
			GII.17 ③		1			
2016/17	13	H28.12.10	GII NT		1			-
			GII.2	1	19		1	100%
14	H28.12.19	GII.2	1	6			100%	
2017/18	15	H30.4.9	GII.2 ①		2			98.6%
			GII.2 ②		1			
			GII.4 ①	1	19	1		99.6%
			GII.4 ②		1			
			GII.17		2			100%
			GII NT	1	2			-

※表 1 において 1 つの検体から複数の遺伝子型が検出されたものについては、表 2 において別々にカウントしているため、表 1 の陽性数と表 2 の数は必ずしも一致しない。  
 ※同じ遺伝子型であっても、1 塩基でも異なるものは、①、②、③と区別した。

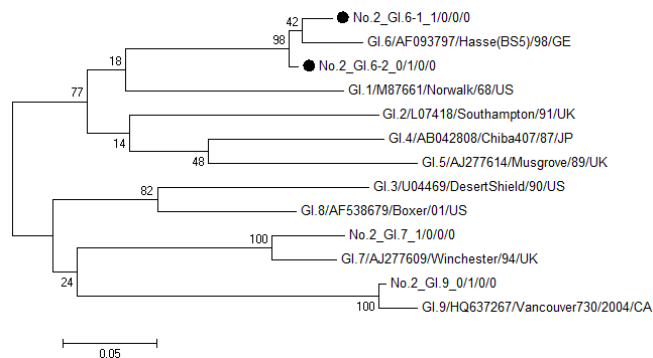


図 1 食中毒事例から検出された NoV GI の系統樹 (260nt)

配列名：事例番号\_遺伝子型\_調理従事者数/発症者数/吐物数/拭取り数

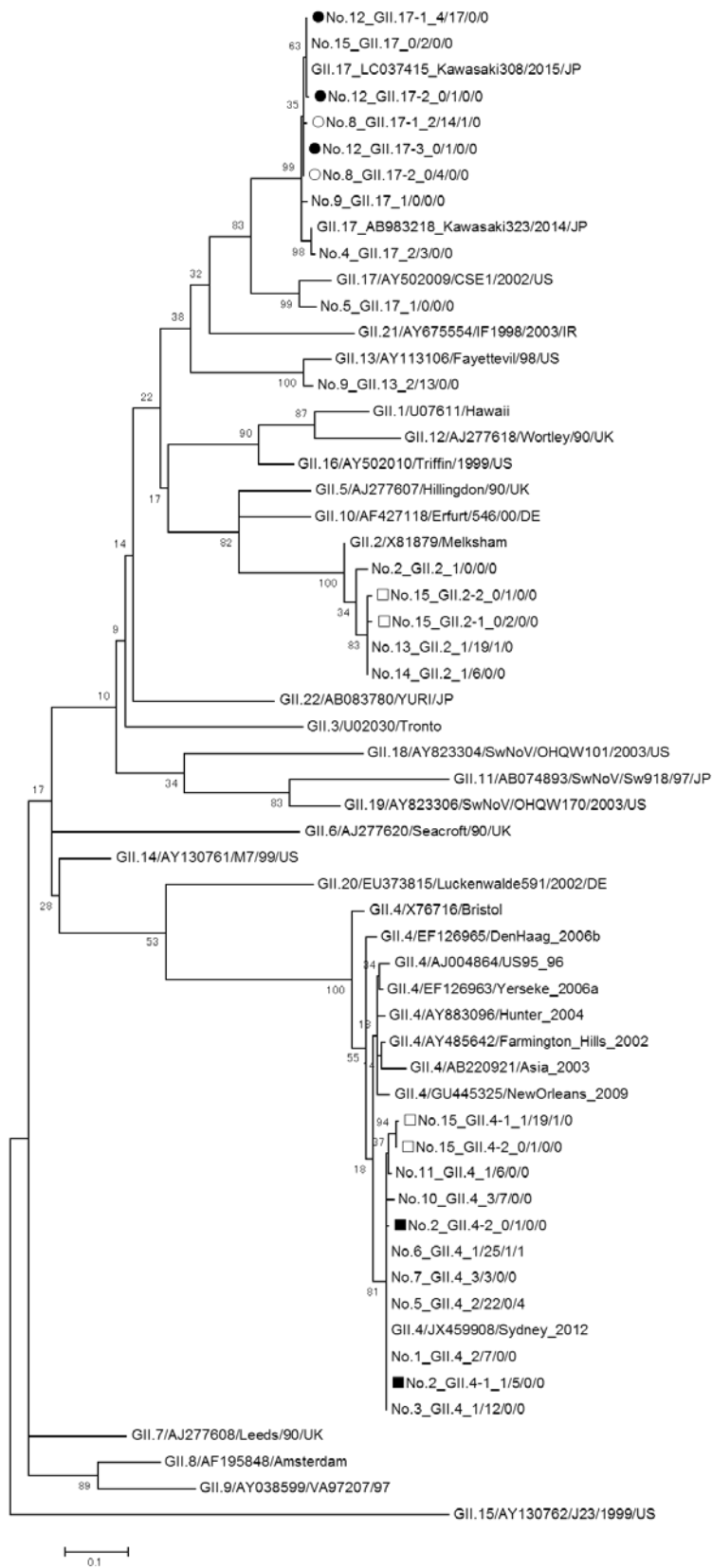


図2 食中毒事例から検出された NoV GII の系統樹 (279nt)

平成 30 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」  
研究分担報告

岩手県におけるノロウイルス集団発生事例の動向と  
不顕性感染者の実態について

研究分担者	上間 匡	国立医薬品食品衛生研究所
研究協力者	高橋 知子	岩手県環境保健研究センター
研究協力者	川上 修央	岩手県環境保健研究センター
研究協力者	藤森 亜紀子	岩手県環境保健研究センター
研究協力者	佐藤 卓	岩手県環境保健研究センター
研究協力者	高橋 雅輝	岩手県環境保健研究センター
研究協力者	岩渕 香織	岩手県環境保健研究センター
研究協力者	梶田 弘子	岩手県環境保健研究センター

### 研究要旨

ノロウイルスの集団発生事例において不顕性感染者の存在は問題となる。2013/14～2017/18 シーズンの岩手県内のノロウイルスによる集団事例において、無症状の調理従事者（事例発生時）の約 10.8% からノロウイルスが検出された。2015 年 1 月～2018 年 5 月のノロウイルスが検出された集団発生事例（114 事例）の感染者（525 名）のうち、不顕性感染者を含む事例（20 事例）の感染者（135 名）を症状の有無別で便中のノロウイルスコピー数を比較した場合、顕性感染者は不顕性感染者より有意に高いことが分かった。遺伝子型別の比較では、ウイルスコピー数に有意な差は認められなかった。しかしながら、不顕性感染者の排泄するウイルスコピー数もまた、十分に感染を拡大させる量であり、集団発生等における感染源となる可能性が示唆された。このことから、不顕性感染者の存在と感染拡大の可能性を認識し、家庭や、集団生活を行う様々な施設におけるノロウイルス等の感染症の拡大防止策を図ることが重要である。

#### A. 研究目的

岩手県におけるノロウイルス集団発生事例の動向を把握し、集団発生事例の原因となりうる不顕性感染者の実態を調査するこ

とで、ノロウイルスによる食中毒等の集団発生の予防およびノロウイルスの感染拡大の防止に資するもの。

## B. 研究方法

### 1. 材料

2013/14～2017/18 シーズンの岩手県内のノロウイルスによる集団発生事例の疫学情報および2015年1月～2018年5月の事例の便検体を対象とした。

### 2. 方法（集団発生の動向）

2013/14～2017/18 シーズンの事例の疫学情報を解析した。

### 3. 方法（感染者の排泄ウイルス量）

検体として提供された患者便、無症状者便の10%糞便乳剤140 $\mu$ lからQIAamp Viral RNA Mini Kit(QIAGEN)を用いてRNA抽出を行った後、PrimeScript RT Master Mix (Perfect Real Time)

(TaKaRa)で逆転写を行いcDNAを合成した。ノロウイルスの検出は、厚生労働省通知法(平成19年5月14日付け食安監発題0514004号)に準じて行った。ノロウイルスが検出された検体について、増幅プライマーCOG1F/G1SKRおよびCOG2F/G2SKRを使用し、得られたPCR産物について、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定し、Norovirus Genotyping

tool(<http://www.rivm.nl/mpf/typingtool/norovirus/#/>)を用いて遺伝子型を同定した。

検出されたノロウイルスコピー数の比較解析に、R version 3.4.3を使用し分散分析及び多重比較を行った。

(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. 集団発生の動向

県内のノロウイルスの集団発生は、例年、11月～1月にピークとなるが、2017年11月～2018年1月に明瞭なピークはなく、例年、患者数の減少する6月にシーズン中、最多の発生があった(図1)。流行した遺伝子型は2016/17シーズンと同様にGII.2、GII.4が主流を占めており、発生施設についても、2016/17シーズンと同様に低年齢層である保育園で多く発生していたが、2016/17シーズンと異なり、小学校、高校、障害者支援施設等の若年層での発生も複数見られた(図2)。

5シーズンの発生状況から、流行する遺伝子型はシーズンごとに異なるが、GII.4は恒常的に流行がみられた(図3)。保育園では、GII.2による大きな流行が2016/17、2017/18シーズンにあったが、GII.2以外の様々な遺伝子型のノロウイルスの集団発生も確認された(図2)。一方、高齢者施設では、食中毒事例1件(GII.17)を除き、単一の遺伝子型(GII.4)の集団発生であった(図4)。

### 2. 感染者の便中排泄ウイルス量

調査期間中の食中毒および感染症にかかるノロウイルス集団発生事例において、事例発生時に無症状の調理従事者の約10.8%から、調理には従事しない職員の約11.3%からノロウイルスが検出された(図5)。2015年1月～2018年5月のノロウイルス集団発生事例(114事例)の感染者(525名)のうち、不顕性感染者を含む事例は、保育所(15事例)の他、小学校、高校、老人福祉施設、飲食店等で20事例あり、感染者135名を症状の有無で便中のノロウイルスコピー数を比較した結果、

顕性感染者は不顕性感染者より有意に高いことが分かった(図6)。また、便中のウイルスコピー数を遺伝子型別で比較した場合、全体では有意な差は認められなかったが、個別の比較において、GⅡ.2はGⅡ.4より有意にコピー数が高かった(図7)。症状の有無による便中のウイルスコピー数を比較した場合には、有症者で遺伝子型による有意差が認められた(ANOVA P=0.048)(図8)。

#### D. 考察

図2にみられるように、保育園で検出される遺伝子型はシーズンによって変動が認められるほか遺伝子型も多様であるが、図1に示すシーズンごとの県内の流行株を反映しており、免疫の低い低年齢層の集団に、周囲に存在する様々な遺伝子型が持ち込まれ、集団発生となっている可能性を示唆するものと考えられた。また、GⅡ.2による集団発生は2016/17～2017/18シーズンに保育園等の低年齢層で多発しているが、2017/18シーズンは保育園等での発生とともに、小学校、高校、障害者支援施設の若年層での発生が複数みられ、保育園での流行が家庭等を介して感染が拡大したことが示唆された。一方、高齢者施設では、食中毒の1例(GⅡ.17)を除き、すべてGⅡ.4によるものであり(図4)、入所者、利用者の免疫応答や、他の遺伝子型に比較して有症期間が長いとされ、また数年おきに変異がみられるGⅡ.4が外部から持ち込まれやすい状況にある等の原因が考えられるが不

明である。

不顕性感染者の排泄するウイルスコピー数は、顕性感染者より有意に低いことがわかったが(図6)、不顕性感染者の便中ウイルスコピー数は平均3.36logと十分に感染を拡大させる量であり、施設職員、調理従事者ともに10%強が不顕性感染者であることから集団発生等における感染源となる可能性が示唆された。今後、遺伝子型、感染者の年齢、発症からの日数、症状、発生施設等の様々な要因を含めた解析をすることにより、遺伝子型による病原性、排泄期間や量の違い等が推定可能となり、集団生活を行う施設での感染防止につながると考える。

#### E. 結論

不顕性感染者の存在と感染拡大の可能性を認識し、家庭や、集団生活を行う様々な施設におけるノロウイルス等の感染症の拡大防止策を図ることが重要である。

#### 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

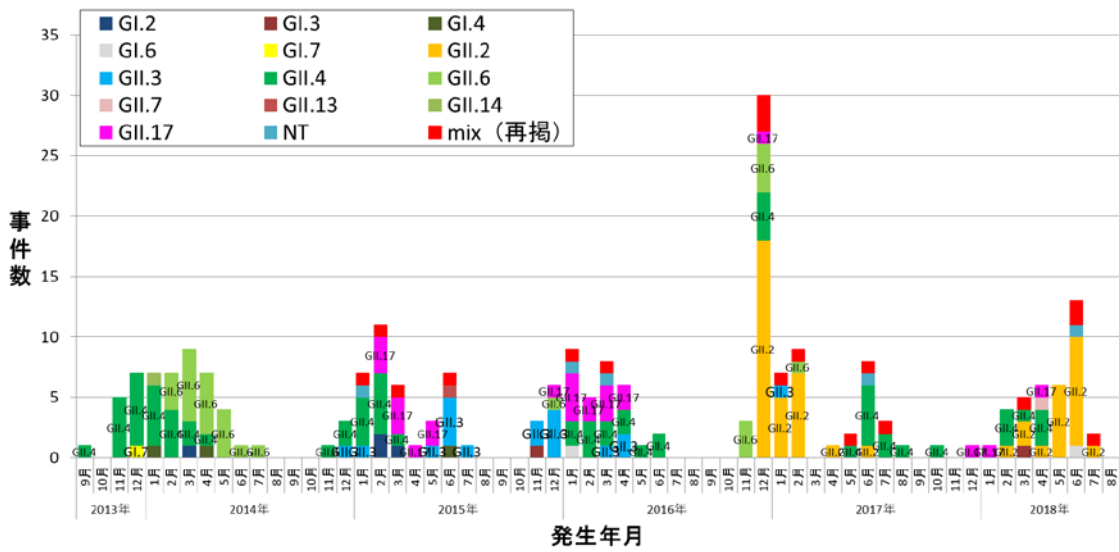


図 1. ノロウイルス遺伝子型月別発生状況(2013/14～2017/18 シーズン、岩手県)

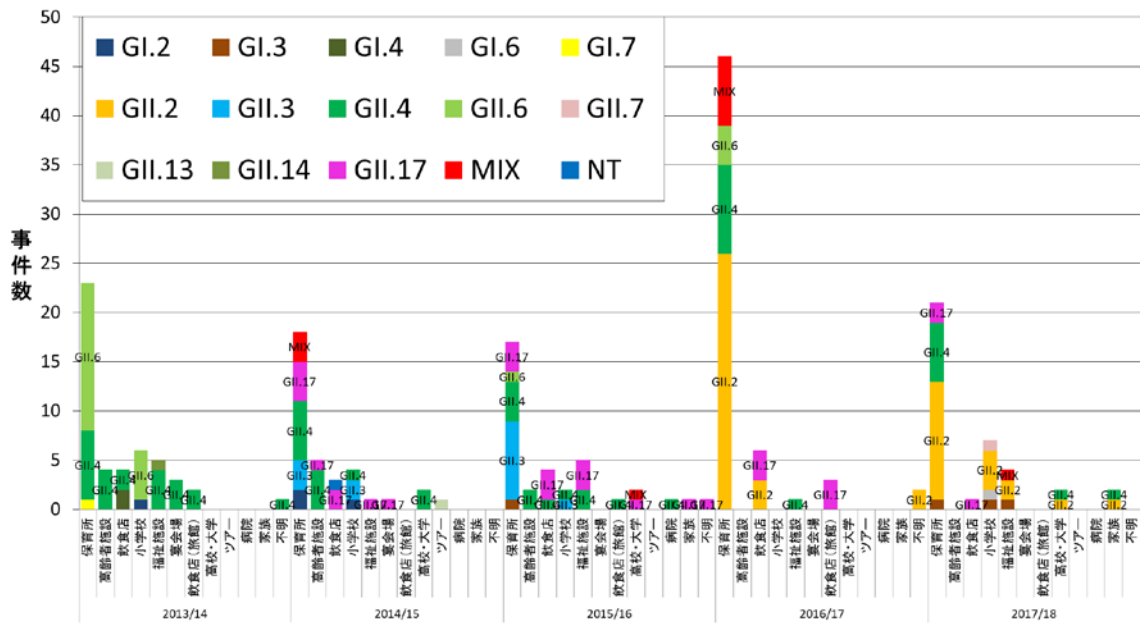


図 2. ノロウイルス施設別遺伝子型発生状況(2013/14～2017/18 シーズン、岩手県)

全体

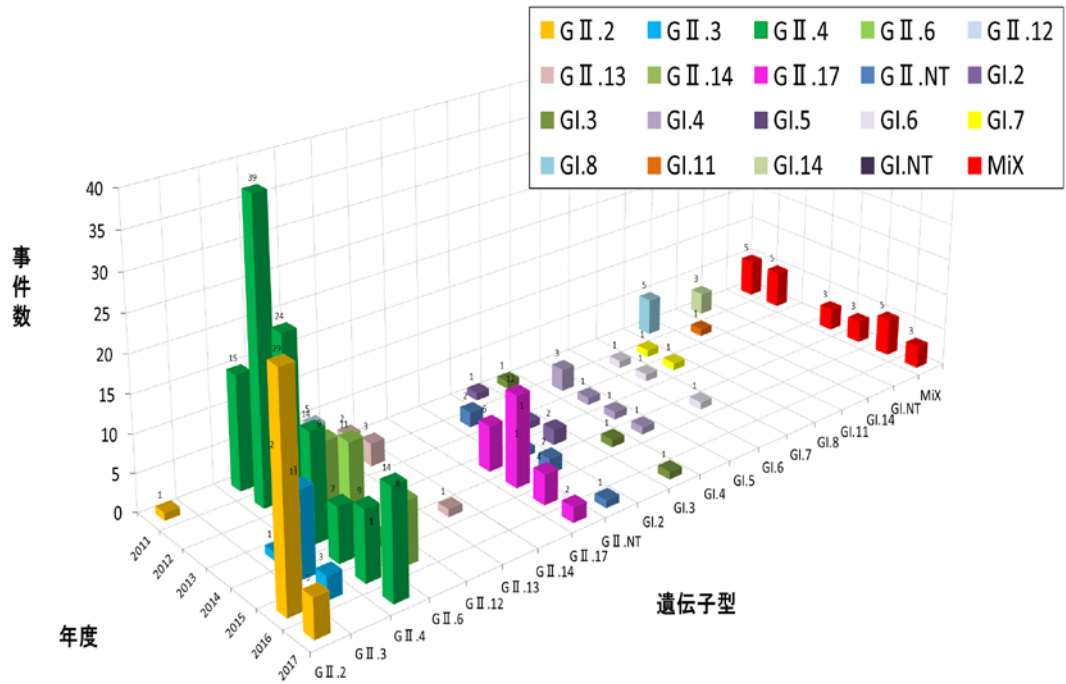


図3. 集団発生事例における遺伝子型別の発生の推移( 2011~2017年度別、岩手県)

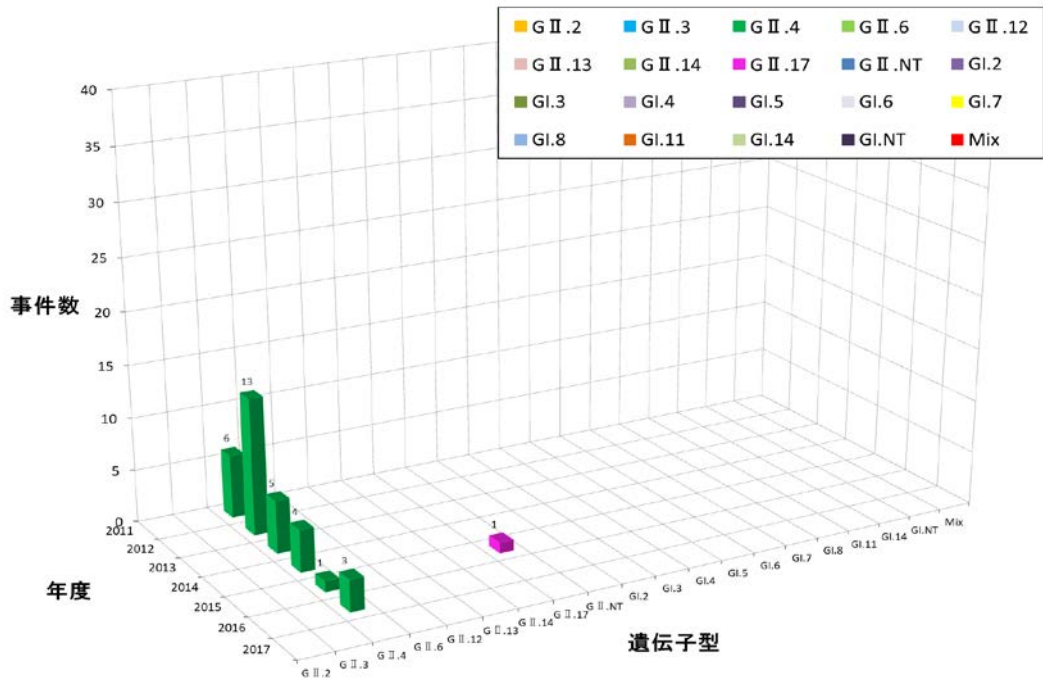


図4. 集団発生事例(高齢者施設)における遺伝子型別の発生の推移 ( 2011~2017年度別、岩手県)

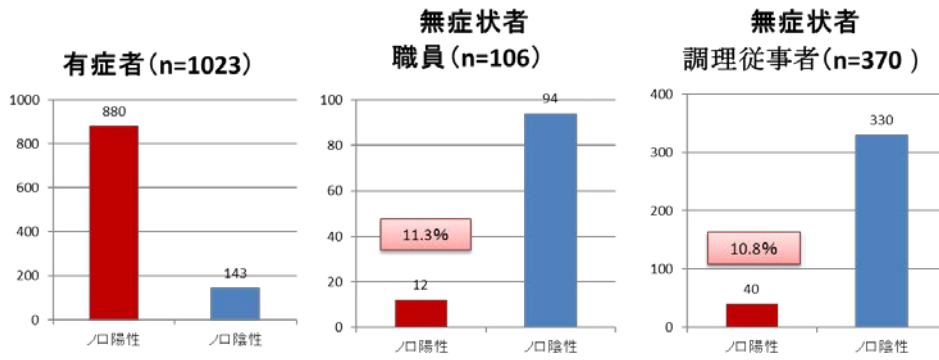
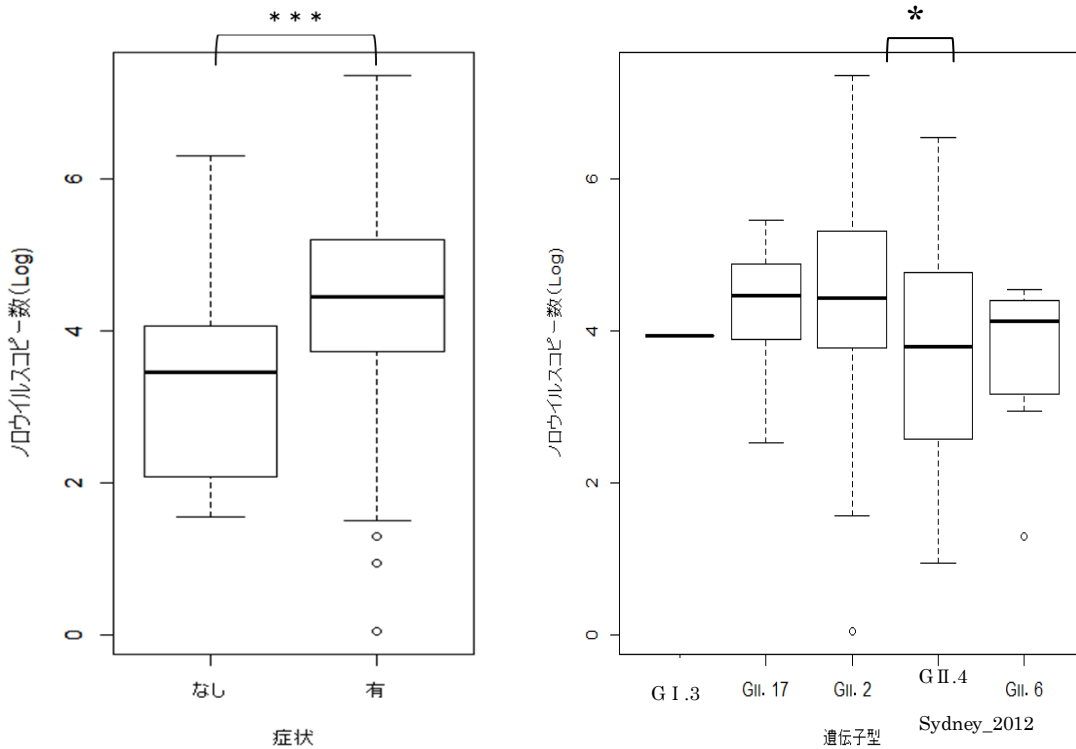


図5. 有症者・無症状者(施設職員、調理従事者)からのノロウイルス検出状況 (2013/14~2017/18シーズン、岩手県)



●有症者のコピー数は、無症状者に比較して有意に高い

有症者(n=105)Log 平均値 : 4.33 (SD : 1.28)

無症状者(n=30)Log 平均値 : 3.36 (SD:1.27)

\*\*\* : P<0.001

●全体で見ると遺伝子型によるコピー数に有意な差は認められない。

●個別で見ると、GI.2 は GI.4 よりも有意にコピー数が高い。

ANOVA P=0.066

GI.4 vs GI.2 \* P=0.044

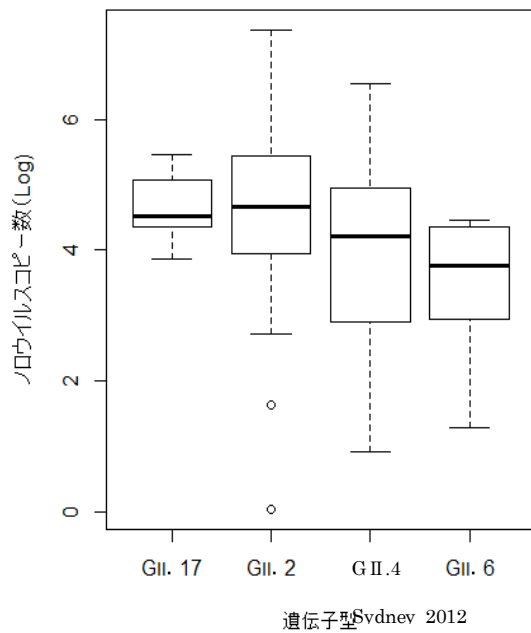
(Tukey の多重比較)

図 6. 症状の有無別ノロウイルスコピー数(Log)

図 7. 遺伝子型別ノロウイルスコピー数(Log)

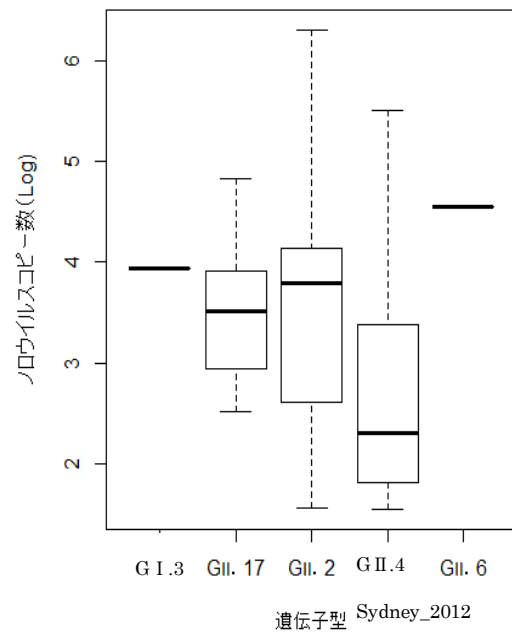


有症者の遺伝子型別のノロウイルスコピー数(Log)



●有症者：遺伝子型による有意差あり  
(ANOVA P=0.048)

無症状者の遺伝子型別ノロウイルスコピー数(Log)



●無症状者：遺伝子型による有意な差は認められず(ANOVA P=0.363)

図 8. 遺伝子型別ノロウイルスコピー数(Log)

平成 30 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

秋田県産岩ガキと生産海域における下水からのノロウイルスの検出  
および 2017/2018 シーズンの市中におけるノロウイルスの検出状況

研究協力者 秋野 和華子 秋田県健康環境センター・保健衛生部  
研究分担者 斎藤 博之 秋田県健康環境センター・保健衛生部

### 研究要旨

2018 年 6 月～8 月に購入した秋田県産の岩ガキ（各月 10 検体）について、ノロウイルス（NoV）の検出を行った。6 月は GII が 6 検体、GI が 4 検体から検出され、GII. 2、GII. 4、GII. 17、GI. 1、GI. 2 の 5 遺伝子型が確認された。7 月は GII が 3 検体、GI が 7 検体から検出され、GII. 2、GII. 4、GII. 17、GI. 2 の 4 遺伝子型が確認された。8 月は GII のみ 1 検体から検出され、GII. 2、GII. 17 の 2 遺伝子型が確認された。定量値（単位：コピー数/g 中腸腺）は 6 月、7 月で  $10^2$  以上の個体が多く存在しており、8 月の 1 検体は  $10^1$  程度と低くなっていた。2018 年 4 月～12 月に採取した下水（各月 1 回採水）についても NoV の検出を行った。GII は 11 月の放流水を除くすべての検体から、GI は 10 月の放流水を除くすべての検体から検出された。検出された GII の遺伝子型は、4 月～6 月、11 月、12 月は GII. 2、GII. 4、GII. 17 で、7 月は GII. 2、GII. 17、8 月、9 月は GII. 2、10 月は GII. 17 であった。GI の遺伝子型は検査を実施した 4 月から 12 月の間、GI. 1、GI. 2、GI. 3、GI. 5、GI. 6 の 5 遺伝子型が検出された。定量値（単位：コピー数/mL）は、GII において流入水の最大値は 5 月の 18.08 で、放流水の最大値は 4 月の 12.86 であった。GI においては流入水の最大値は 10 月の 6.75 で、放流水の最大値は 7 月の 9.08 であった。

2017/2018 シーズンの秋田県における食中毒事例は、1 事例のみで NoV GII. 4 が検出された。集団感染事例および感染症発生動向調査において検出された NoV の遺伝子型は、GII. 2 が最も多く、4 月、5 月に検出数が増加していた。

今回の結果から、岩ガキと下水における NoV の汚染状況は、市中の流行と相関する可能性が示唆された。

#### A. 研究目的

カキ等二枚貝は、下水処理を潜り抜け  
生育海域に流れ出たノロウイルス（NoV）

を、消化器官である中腸腺に取り込み蓄  
積すると考えられている。とりわけ、中  
腸腺ごと生で喫食する機会が多いカキは、

NoV による食中毒を引き起こす原因食品の一つとなっている。今回、生食が主である夏場の岩ガキについて NoV の検出を試みるとともに、生産海域付近の下水についても NoV の検査を行い、その汚染状況を調査した。

また、秋田県において 2017/2018 シーズンに感染性胃腸炎患者から検出された NoV の状況についても併せて報告する。

## B. 研究方法

### 1. 材料および対象

#### 1) 秋田県産殻付き岩ガキ

2018 年 6 月、7 月、8 月に秋田県内で購入した岩ガキ（秋田県産 1 海域）について、中腸腺 1 個を 1 検体とし、各月 10 検体ずつ検査を行った。

#### 2) 下水

2018 年 4 月～12 月に秋田市内の下水処理場（1 か所）にて月 1 回（毎月第 4 月曜または火曜の午前）ずつ採取した流入水と放流水それぞれ 9 検体について、検査を実施した。

#### 3) 食中毒事例および集団感染事例

2017 年 9 月～2018 年 8 月（2017/2018 シーズン）に NoV が検出された食中毒事例 1 事例と集団感染事例 10 事例を集計対象とした（中核市である秋田市分の事例は除く）。

#### 4) 感染症発生動向調査

病原体定点医療機関において、2017 年 9 月～2018 年 8 月（2017/2018 シーズン）に小児科から採取された糞便検体 288 検

体のうち NoV が検出された 82 検体を集計対象とした。

## 2. 方法

### 1) 岩ガキからのウイルス検出

厚生労働省通知法（平成 19 年 5 月 14 日付け食安監発第 0514004 号）「貝の中腸腺を用いた方法（超遠心法）」に準じ濃縮を行い、QIAamp Viral RNA Mini Kit（QIAGEN）により核酸を抽出した。抽出時にはニッポンジーンの「DNaseI（RT Grade）」を用い、オンカラム DNaseI 処理を実施した。その後、Kojima らの方法（J. Virol. Methods, 100, 107-114, 2002）による RT-PCR と、Kageyama らの方法（J. Clin. Microbiol., 41, 1548-1557, 2003）による nested リアルタイム PCR にて定性検査を行い、陽性検体については Capsid N/S 領域遺伝子を増幅し、ダイレクトシーケンスにて塩基配列を決定した。今回、GII の増幅プライマーとして、SK プライマーに加え、特異的プライマー（GII. 2、GII. 4、GII. 17）を用い、複数の遺伝子型の検出を試みた（表 1）。同時に、GII. 4 については「ノロウイルス GII/4 2012 変異株検出用プライマーセット」（日本遺伝子研究所）を、GII. 17 については「Hypercool テクノロジー™による新型ノロウイルス検出用プライマー&プローブ」（日本遺伝子研究所）を使用しての確認も行った。また、定量値はリアルタイム RT-PCR にて測定し算出した。

### 2) 下水からのウイルス検出

食品衛生検査指針微生物編 2015 年版「拭取りからのウイルス検出法」を参考

に濃縮を行った。夾雑物の多い流入水については予めろ過（定性濾紙：No. 2）を行い検体液とした。検体 1L にポリエチレングリコール 6,000（最終濃度 12%）、NaCl（最終濃度 1mol/L）、MULLER-HINTON BROTH:OXOID（最終濃度 0.5%）を添加し、4°C で一夜放置後、検体 800mL を分取し、4°C、6,000rpm、20 分間遠心し、得られた沈殿物に PBS(-)150 $\mu$ L を添加した懸濁液を濃縮検体とした。核酸の抽出は自動核酸精製抽出装置（MagNA Pure LC2.0:Roche）で行い、その後は岩ガキからのウイルス検出と同様に検査を実施した。

### 3) 糞便検体からのウイルス検出

糞便乳剤から QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) により核酸を抽出した。その後、Kageyama らの方法 (J. Clin. Microbiol., 41, 1548-1557, 2003) によりリアルタイム RT-PCR を行い、陽性検体については Capsid N/S 領域遺伝子を増幅し、ダイレクトシーケンスにて塩基配列を決定した。遺伝子型別は、Norovirus Genotyping Tool Version 2.0 (<https://www.rivm.nl/mpf/typingtool/norovirus>) および Blast 検索を用いて行った。

#### (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. 岩ガキからの検出状況

#### 1) 6月の岩ガキ (表 2)

10 検体中 6 検体から GII が検出され、4

検体から GI が検出された。そのうち 3 検体は GII と GI が同時に検出された。確認された遺伝子型は GII が GII. 2、GII. 4、GII. 17 で、GI は GI. 1、GI. 2 であった。GII の定量値 (単位: コピー数/g 中腸腺) は、 $10^2$  以上  $10^3$  未満が 3 検体、 $10^3$  以上が 1 検体で、2 検体については極微量のため定量値が得られなかった。GI の定量値は  $10^1$  以上  $10^2$  未満が 1 検体、 $10^2$  以上  $10^3$  未満が 3 検体であった。

#### 2) 7月の岩ガキ (表 3)

10 検体中 3 検体から GII が検出され、7 検体から GI が検出された。そのうち 2 検体は GII と GI が同時に検出された。確認された遺伝子型は GII が GII. 2、GII. 4、GII. 17 で、GI は GI. 2 のみであった。GII の定量値は、 $10^1$  以上  $10^2$  未満が 2 検体、 $10^2$  以上  $10^3$  未満が 1 検体であった。GI の定量値は  $10^1$  以上  $10^2$  未満が 1 検体、 $10^2$  以上  $10^3$  未満が 6 検体であった。

#### 3) 8月の岩ガキ (表 4)

10 検体中 1 検体から GII のみが検出され、確認された遺伝子型は GII. 2、GII. 17 であった。定量値は  $10^1$  以上  $10^2$  未満であった。

### 2. 下水からの検出状況 (表 5)

GII は 11 月の放流水を除くすべての検体から、GI は 10 月の放流水を除くすべての検体から検出された。検出された GII の遺伝子型は、4 月~6 月、11 月、12 月は GII. 2、GII. 4、GII. 17 の 3 遺伝子型、7 月は GII. 2、GII. 17 の 2 遺伝子型、8 月、9 月は GII. 2、10 月は GII. 17 の 1 遺伝子

型であった。GI の遺伝子型は検査を実施した4月から12月の間、5種類 (GI. 1、GI. 2、GI. 3、GI. 5、GI. 6) が検出された。定量値 (単位: コピー数/mL) は、GII において流入水の最大値は5月の18.08で、放流水の最大値は4月の12.86であった。10月の放流水は定量限界以下であった。GI においては流入水の最大値は10月の6.75で、放流水の最大値は7月の9.08であった。6月、8月、9月の流入水と8月の放流水は定量限界以下であった。

### 3. 食中毒事例におけるウイルスの検出状況

食中毒事例の詳細について表6に示す。2017/2018 シーズンは NoV が検出された1事例のみの発生で、原因食品の特定には至らない事例であった。検出遺伝子型は GII. 4 Sydney 2012 であった。

### 4. 集団感染事例における NoV の遺伝子型別検出状況

集団感染事例において検出された NoV の遺伝子型について表7に示す。GII. 4 Sydney 2012 が5例 (41.7%) と最も多かった。次いで、GII. 2、GII. 17 がそれぞれ2例 (16.7%) から検出され、GI. 2、GI. 4、および GI. 7 は1例 (8.3%) ずつの検出であった。4月に GI. 2 が検出された1例は同時に GI. 7 が検出され、また、5月に GII. 2 が検出された1例は同時に GI. 4 が検出された事例であった。

### 5. 感染症発生動向調査における NoV の遺伝子型別検出状況

感染症発生動向調査において検出され

た NoV の遺伝子型について表8に示す。GII. 2 が50例 (57.5%) と最も多く、その検出は2018年2月以降に増加しており、4月がピークであった。次いで、21例 (24.1%) の検出があった GII. 4 Sydney 2012 は2018年5月に多く確認された。GI. 4 は6例 (6.9%) から検出され、そのうち4例は GII. 2 も同時に検出された。GII. 17、GI. 5 はそれぞれ3例 (3.4%) が検出され、GI. 5 が検出された1例は同時に GII. 2 も検出された。GI. 7 は2例 (2.3%) から検出され、GII. 8 および GI. 6 は1例 (1.2%) ずつの検出であった。

### D. 考察

今回、出荷期間である6月～8月に購入した岩ガキにおいて、すべての月の検体から NoV が検出された。特に、6月の岩ガキにおいては定量値が  $10^2$  以上である個体が多く存在していた。定量値においては、胃腸炎に関連したカキの NoV 汚染量が  $10^3$  コピー数/g 程度であったとする報告がある (食品衛生学雑誌 2017 Vol. 58 No. 1)。岩ガキ1個当たりの中腸腺が1～3g 程度であったことから、それらの供試岩ガキは1～数個の喫食で感染が成立する可能性があると考えられた。また、6月、7月の岩ガキにおいては、多くの個体から GI. 2 の遺伝子型が検出されており、同時期に採取した下水検体からも同様の遺伝子型が確認されている。この時期、本県では感染症発生動向調査および食中毒・集団感染事例において GI. 2 が検出されていないことから、この遺伝子型が成人での不顕性感染やカキ等二枚貝により環境中で維持されていた可能性も考えら

れた。加えて、岩ガキや下水からは市中の流行とは関係なく、GII.17 が高頻度で検出された。この遺伝子型はカキとの関連性が強いと考えられており（食品衛生学雑誌 2017 Vol.58 No.1）、今回の結果からも不顕性感染やカキにより環境中で維持され続けている可能性が考えられた。2017/2018 シーズンの本県における感染症発生動向調査による NoV の検出数は、4月～6月に多くなっていたが、この結果は、GII における下水の定量値と挙動が一致していた。また、6月の岩ガキにおける定量値も高かったことから、市中の NoV の流行が下水中のウイルス量に影響を及ぼし、岩ガキにおける NoV の蓄積に繋がっていたものと考えられた。本来、岩ガキは NoV の非流行期である夏季に出荷されるため、感染の可能性が低いと考えられてきた。しかしながら、近年、NoV の流行は冬場に限局したものではなくなっているように思われる。今後も NoV の流行状況には注視していく必要があると考えられた。

カキ等二枚貝や下水の検体には、NoV の遺伝子型が複数混在しており、通常、これらを確認するためには次世代シーケンサーやクローニング等の手法が行われている。しかし、これらの方法には機器の保有や時間と手間が必要になるため、今回は、近年流行している NoV GII の 3 遺伝子型（GII.2、GII.4、GII.17）を選択し、その特異的プライマーを使用することで複数の遺伝子型についての検索を試みた。その結果、3 遺伝子型の確認には至ったが、この方法では、その他の遺伝子型が存在する場合の検出は不可能とな

る。検索する遺伝子型を選択し、そのつど特異的プライマーの作成が必要となるため、市中の流行状況を把握した後の確認には有効であるが、流行の早期探知という目的においては不向きであると考えられる。早期探知を目的としたカキ等二枚貝や下水における詳細の解析には次世代シーケンサーによる検出が望ましいと思われた。

下水の検査については、今回、簡便且つウイルスの回収効率の向上を考慮して選択した濃縮方法であったが、得られた定量値は他の方法と比較して低いものと思われた。今後は、その原因も追究し、より定量性を確保できる検査方法の検討も必要であると考えられた。

## E. 結論

岩ガキおよび下水からの NoV の検出は、市中の流行状況と相関するものと考えられた。今後はさらにデータを蓄積し、NoV の市中の流行状況と岩ガキの NoV 汚染との関連を明らかにした上で、啓発および情報提供に役立てて行きたいと考えている。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Konno T, Takahashi S, Ogawa C, Kashio H, Kumagai Y, Akino W, Saito H, Sasaki K, Kato Y, Daimon Y, Takashima M, Toyoshima Y, Detection of multiple pathogens from a patient with traveler's diarrhea and information regarding the tests performed - Akita Prefecture. Infectious Agents Surveillance Report, 39 (12),

17-18 (2018).

## 2. 学会発表

1) 秋野和華子、斎藤博之、野田衛、上間匡：市販アサリからのノロウイルスの検出状況、第39回日本食品微生物学会学術総会、2018、大阪

2) 斎藤博之、秋野和華子、野田衛、上間匡：パンソルビンの再固定によるノロウイルスの回収率向上、第39回日本食品微生物学会学術総会、2018、大阪

3) Saito H, Akino W, Sato H, Fujiya Y, Shibata C, Sato R and Shimizu : Isolation of enterovirus D68 using suckling mice and the background. 第66回日本ウイルス学会学術集会、2018、京都

4) 斎藤博之、秋野和華子、佐藤寛子、清水優子、早川智、牛島廣治、野田衛、上間匡：生カキ喫食後の胃腸炎症例から得られたノロウイルス感染の特徴、第114回日本食品衛生学会学術講演会、2018、広島

5) 斎藤博之、秋野和華子、佐藤寛子、藤谷陽子、柴田ちひろ、佐藤了悦、清水博之：乳飲みマウスによるエンテロウイルス D68 型の分離、第32回秋田応用生命科学研究会講演会、2018、秋田

## 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 特異的プライマーの配列

G II. 2 <sup>*1</sup>	F : ATG GTG CAG CCG GCC TCG TG R : CCC AAC TCT AGA TTC AGT AGC
G II. 4 <sup>*2</sup>	F : CAA CCC ATC TGA TGG GTC CG R : GCC CAA GGG CGC GCT CCA
G II. 17 <sup>*2</sup>	F : GCC GCT CCA TCT AAT GAT GG R : TAT ACA TCC TTG ACA AAT GAG CC

\*1) 本研究において作成

\*2) 平成 27 年度 総括・研究分担報告書 (新潟県保健科学研究所 田村)

表 1 シークエンス用プライマー 参照

表 2 岩ガキからの NoV 検出状況 (2018 年 6 月)

シーズン	購入月	個数	採取量 (g)	ノロウイルス			
				G II		G I	
				遺伝子型	コピー数/g中腸腺	遺伝子型	コピー数/g中腸腺
2017/18	6月	1	2.40	(-)	NT	(-)	NT
		1	2.18	GII. 4 <sup>*1</sup> 、GII. 17	614.90	GI. 2	114.51
		1	1.50	GII. 2	0.00 <sup>*2</sup>	(-)	NT
		1	2.78	GII. 2、GII. 4 <sup>*1</sup>	1098.04	GI. 1	436.08
		1	2.62	GII. 2、GII. 4 <sup>*1</sup> 、GII. 17	903.53	GI. 2	95.69
		1	2.12	(-)	NT	(-)	NT
		1	2.89	GII. 2、GII. 4 <sup>*1</sup>	0.00 <sup>*2</sup>	(-)	NT
		1	2.40	(-)	NT	GI. 2	702.75
		1	2.53	GII. 2、GII. 4 <sup>*1</sup>	890.98	(-)	NT
1	2.57	(-)	NT	(-)	NT		

\*1) GII. 4 : GII. 4 Sydney 2012

\*2) 0.00 : 定量限界以下

表 3 岩ガキからの NoV 検出状況 (2018 年 7 月)

シーズン	購入月	個数	採取量 (g)	ノロウイルス			
				G II		G I	
				遺伝子型	コピー数/g中腸腺	遺伝子型	コピー数/g中腸腺
2017/18	7月	1	1.73	(-)	NT	GI. 2	467.45
		1	1.49	GII. 2、GII. 17	95.37	(-)	NT
		1	1.50	(-)	-	GI. 2	243.45
		1	1.70	(-)	NT	GI. 2	636.86
		1	1.97	GII. 2、GII. 4 <sup>*</sup>	26.70	GI. 2	46.43
		1	1.67	(-)	NT	(-)	NT
		1	2.14	(-)	NT	(-)	NT
		1	1.58	(-)	NT	GI. 2	442.35
		1	1.84	GII. 2	181.33	GI. 2	177.88
		1	1.68	(-)	NT	GI. 2	787.45

\*) GII. 4 : GII. 4 Sydney 2012



表4 岩ガキからのNoV検出状況（2018年8月）

シーズン	購入月	個数	採取量 (g)	ノロウイルス			
				G II		G I	
				遺伝子型	コピー数/g中腸腺	遺伝子型	コピー数/g中腸腺
2017/18	8月	1	2.30	(-)	NT	(-)	NT
		1	1.42	(-)	NT	(-)	NT
		1	1.29	(-)	NT	(-)	NT
		1	1.33	(-)	NT	(-)	NT
		1	1.68	(-)	NT	(-)	NT
		1	1.65	(-)	NT	(-)	NT
		1	2.28	(-)	NT	(-)	NT
		1	1.59	(-)	NT	(-)	NT
		1	1.33	GII. 2、GII. 17	93.80	(-)	NT
		1	2.01	(-)	NT	(-)	NT

表5 下水からのNoV検出状況（2018年4月～12月）

シーズン	採水月	採水年月日	検体名	ノロウイルス				
				G II		G I		
				遺伝子型	コピー数/mL	遺伝子型	コピー数/mL	
2017/18	4月	2018年4月24日	流入水	GII. 2、GII. 4 <sup>*1</sup> 、GII. 17	16.08	GI. 3	3.71	
			放流水	GII. 2、GII. 4 <sup>*1</sup> 、GII. 17	12.86	GI. 5	8.66	
	5月	2018年5月21日	流入水	GII. 2、GII. 4 <sup>*1</sup>	18.08	GI. 1	1.55	
			放流水	GII. 2、GII. 4 <sup>*1</sup> 、GII. 17	10.17	GI. 6	3.13	
	6月	2018年6月18日	流入水	GII. 2、GII. 4 <sup>*1</sup> 、GII. 17	3.36	GI. 1	0.00 <sup>*2</sup>	
			放流水	GII. 2、GII. 4 <sup>*1</sup> 、GII. 17	8.28	GI. 2	3.08	
	7月	2018年7月23日	流入水	GII. 2、GII. 17	5.33	GI. 2	4.19	
			放流水	GII. 2、GII. 17	4.98	GI. 5	9.08	
	8月	2018年8月20日	流入水	GII. 2	1.67	GI. 3	0.00 <sup>*2</sup>	
			放流水	GII. 2	0.58	GI. 5	0.00 <sup>*2</sup>	
	2018/19	9月	2018年9月18日	流入水	GII. 2	0.45	GI. 3	0.00 <sup>*2</sup>
				放流水	GII. 2	3.84	GI. 3	1.10
10月		2018年10月22日	流入水	GII. 17	3.70	GI. 5	6.75	
			放流水	GII. 17	0.00 <sup>*2</sup>	(-)	NT	
11月		2018年11月19日	流入水	GII. 2、GII. 4 <sup>*1</sup> 、GII. 17	1.03	GI. 5	2.90	
			放流水	(-)	NT	GI. 2	0.49	
12月		2018年12月17日	流入水	GII. 2、GII. 4 <sup>*1</sup> 、GII. 17	10.75	GI. 5	1.29	
			放流水	GII. 2、GII. 4 <sup>*1</sup> 、GII. 17	8.08	GI. 6	0.98	

\*1) GII. 4 : GII. 4 Sydney 2012

\*2) 0.00 : 定量限界以下

表6 秋田県における食中毒事例の詳細 (2017/2018 シーズン)

依頼年月日	推定原因食品	原因施設	検出ノロウイルス遺伝子型
2018年3月3日	不明 (会食料理)	飲食店	GII.4 Sydney 2012

表7 集団感染事例において検出された NoV の遺伝子型 (2017/2018 シーズン)

遺伝子型	2017/2018シーズン												計
	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	
GII.2								1	1*2				2
GII.4 Sydney 2012					2	1			1			1	5
GII.17				1			1						2
GI.2								1*1					1
GI.4									1*2				1
GI.7								1*1					1
計	0	0	0	1	2	1	1	3	3	0	0	1	12

(株数)

\*1 : 4月の2事例中1事例より GI.2 と GI.7 の2種類の遺伝子型を検出

\*2 : 5月の2事例中1事例より GII.2 と GI.4 の2種類の遺伝子型を検出

表8 感染症発生動向調査において検出された NoV の遺伝子型 (2017/2018 シーズン)

遺伝子型	2017/2018シーズン												計
	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	
GII.2						1	5	18*1,2	14	7	3	2	50
GII.4 Sydney 2012				1	1	2	2	5	6	4			21
GII.8									1				1
GII.17					1		1	1					3
GI.4								5*1	1				6
GI.5					2			1*2					3
GI.6					1								1
GI.7								2					2
計	0	0	0	1	5	3	8	32	22	11	3	2	87

(株数)

\*1 : 4月の27検体中4検体より GII.2 と GI.4 の2種類の遺伝子型を検出

\*2 : 4月の27検体中1事例より GII.2 と GI.5 の2種類の遺伝子型を検出

平成 30 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」班  
研究協力報告

## 宮城県における感染性胃腸炎起因ウイルスの挙動と流行状況

研究協力者	坂上亜希恵	宮城県保健環境センター
研究協力者	植木 洋	宮城県保健環境センター
研究分担者	上間 匡	国立医薬品食品衛生研究所

### 研究要旨

2014/2015 シーズンから 2018/2019 シーズンに宮城県内で検出されたノロウイルス (NoV) について、遺伝子型を比較した結果、シーズンを通じて GII.4 が最も多く検出された。一方、シーズンによっては GII.2, GII.17 による流行も確認された。また、2018 年 1 月から 2018 年 12 月に採取した流入下水 52 検体を対象に NoV およびサポウイルス (SaV) 遺伝子を定量的に検出した結果、NoV, SaV とともに遺伝子は通年検出され、SaV は昨シーズンに引き続き年間を通して NoV よりも高い濃度で検出された。

### A. 研究目的

2014/15 シーズンから 2018/19 シーズンに宮城県内で検出されたノロウイルス (NoV) の遺伝子型の特徴を把握するとともに今シーズンの感染性胃腸炎の流行状況について昨シーズンと比較した。

あわせて、流入下水の調査において NoV に加えてサポウイルス (SaV) をモニタリング対象とし、感染性胃腸炎流行の早期察知の可能性について検討を行った。

### B. 研究方法

#### 1. 材料

1) 感染性胃腸炎患者の報告数と臨床検体  
2017/18 シーズンと 2018/19 シーズンの感染性胃腸炎患者報告数は、宮城県結核・感染症情報センターおよび国立感染

症研究所による感染症発生動向調査の小児科定点における感染性胃腸炎患者報告数を用いた。

また、2014/15 シーズンから 2018/19 シーズンの期間に県内で発生した NoV を原因とする感染性胃腸炎集団発生事例 165 事例から検出された NoV 遺伝子を分子疫学的に解析し、遺伝子型の比較を行った。

#### 2) 下水試料

県内の都市部に位置する下水処理場の流入下水を 2018 年 1 月から 2018 年 12 月の毎週 1 回採水し、計 52 検体を試料とした。検体は 200 mL の滅菌ポリ容器に採取し、 $-30^{\circ}\text{C}$  で保管した。

#### 2. 検体処理

1) 感染性胃腸炎の糞便検体

通知法に準じて糞便を滅菌蒸留水で10%乳剤とし、9,100×gで10分間冷却遠心後、上清をRNA抽出用試料とした。

## 2) 下水試料

検体は解凍後十分に転倒混和し、25 mLを検査に供した。ポリエチレングリコールおよびNaClを終濃度がそれぞれ0.08 g/mL、0.021 g/mLとなるように加え、4°Cで1晩攪拌した後、9,100×gで20分間冷却遠心した。上清をアスピレーターで吸引除去し、沈渣の状況に応じに滅菌蒸留水を1.0mlから1.5ml加え、5.0 mLのクライオチューブに洗い込み、ウイルス濃縮液とした。

## 3. ウイルス遺伝子の抽出と各ウイルス遺伝子の検出

糞便乳剤の遠心上清および下水濃縮液各々140 µLについてQIAamp Viral RNA mini kit(QIAGEN)を用いてウイルスRNAを抽出した。

逆転写反応および各ウイルス遺伝子の検出は図1に示した方法で行った。

NoVおよびSaV遺伝子の検出はreal-time PCR法により行い、検量線は国立感染症研究所より分与された既知濃度の陽性コントロールを用いて作成した。下水試料については試料中のコピー数を算出し、下水1 L当たりのコピー数に換算して示した。

また、糞便検体からNoV遺伝子が検出された場合はダイレクトシーケンスを行い、MEGA6でアライメント後、BlastまたはNorovirus typing toolを用いて遺伝子型を決定した。

(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. 県内における感染性胃腸炎の流行状況

2018年は第3週、第22週、第49週に小さなピークが見られたものの、小児科定点における感染性胃腸炎患者報告数は6.2人、7.3人、8.9人であり、全国的にNoVGII.2による感染性胃腸炎が大流行した2016年と比較すると、流行期の小児科定点における患者報告数が著しく少なかった(図2)。また、2018年1月から12月に県内で発生した感染性胃腸炎の集団発生は19事例であり、NoVが12件、SaVが6件、ロタウイルスが2件、アストロウイルスが1件検出された。このうち、NoVとSaV、NoVとアストロウイルス、ロタウイルスとアデノウイルスが同一事例で重複して検出された(図3)。NoVが関与した12事例から検出されたNoVの遺伝子群は全てGII群であり、遺伝子型はGII.2が9事例、GII.4が3事例とGII.2が多い傾向だった(図4)。

今シーズンに検出された遺伝子型を過去5シーズンと比較すると、GII.4は全てのシーズンで検出されており、2016/2017シーズンを除いて流行の主体であった。亜型は約90%がGII.4\_Sydney\_2012であった。2016/17シーズンはGII.2が遺伝子型を決定できた株の90%以上を占めていた。また、2014/15シーズンと2015/16シーズンにはGII.17 Kawasaki株近縁株もそれぞれ27%と25%確認された。(図

5)。

## 2. 流入下水中からのウイルス遺伝子検出状況

### 1) NoV の検出状況

NoV は第 43 週を除いた調査期間中の全検体から検出された。G I 群は 0.0 copies/L $\sim$ 3.5 $\times$ 10<sup>6</sup> copies/L, G II 群は 0.0 copies/L $\sim$ 1.1 $\times$ 10<sup>7</sup> copies/L で, G I 群と比較し全体的に G II 群が高い値で検出された。

G II 群はこれまでの傾向と異なり, 第 18 週 (5 月上旬) から第 22 週 (5 月下旬) の従来の非流行期に, 4.3 $\times$ 10<sup>6</sup> copies/L $\sim$ 1.1 $\times$ 10<sup>7</sup> copies/L と高い値で検出された。遺伝子型は第 18 週から第 22 週については G II.2 型が検出されており, 同時期に発生した感染性胃腸炎患者から検出された遺伝子型と一致した。さらに, 第 18 週から第 33 週 (8 月中旬) にかけて, 下水中の G II 群遺伝子濃度の推移と小児科定点における感染性胃腸炎患者報告数の推移が同様の傾向を示した (図 6)。

G I 群は下水中から G I.1 型, G I.2 型, G I.3 型, G I.4 型, G I.5 型, G I.6 型, G I.7 型など様々な遺伝子型が検出されたが, 胃腸炎患者検体から G I 群遺伝子は検出されなかった。

また, 第 1 週 (1 月上旬) から第 8 週 (2 月下旬), 第 46 週 (11 月中旬) から第 52 週 (12 月下旬) にかけて小児科定点における感染性胃腸炎患者報告数の小さなピークが見られたが, その期間の流入下水中の NoV 遺伝子濃度にはほとんど変動がなかった (図 6)。

### 2) SaV の検出状況

SaV 遺伝子も通年流入下水中から検出

された。第 1 週から第 8 週, 第 46 週から第 52 週と 2 つのピークがみられ, 第 1 週で 2.8 $\times$ 10<sup>7</sup> copies/L, 第 47 週で 9.3 $\times$ 10<sup>7</sup> copies/L と高い値で検出された (図 7)。第 46 週から第 52 週では G I.1 型が検出され, 同時期に発生した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, 第 1 週から第 8 週, 第 46 週から第 52 週にかけて, 流入下水中の SaV 遺伝子濃度の推移と小児科定点における感染性胃腸炎患者報告数の推移がほぼ一致していた (図 7)。

## D. 考察

2018/2019 シーズンは昨シーズンに引き続き, 感染性胃腸炎流行期の小児科定点における患者報告数や集団発生事例数が著しく少なかった。また, 例年の傾向と異なり, 4 月から 6 月に感染性胃腸炎集団発生事例が 10 事例とシーズン中最も多く確認された。集団発生事例から検出された NoV の遺伝子型は 5 事例中 3 事例が G II.4 であり, 全て G II.4\_Sydney\_2012 近縁株であった。過去 5 シーズンを通して, 検出された G II.4 は約 90% が G II.4\_Sydney\_2012 であった。2012 年のような G II.4 の変異による新たな流行は確認されなかったが, G II.4\_Sydney\_2012 は 2012 年以降宮城県内において NoV による感染性胃腸炎の主体となっていると考えられた。

下水処理施設の流入下水からは NoV の G I 群, G II 群ともにほぼ通年検出されたが, G II 群の濃度が高い傾向が認められ, G II 群感染者の存在割合が高いことが考えられた。また, 流入下水においても, G

II群が従来の非流行期である5月に高い値で検出され、同時期に発生した感染性胃腸炎患者便から検出された遺伝子型と一致した。

SaVもNoVと同様に通年検出されており、特に高濃度で検出された週の前後では、同じ遺伝子型による集団発生事例も確認された。また、1月上旬から2月下旬、11月中旬から12月下旬にかけて小児科定点における感染性胃腸炎患者報告数の小さなピークが確認され、流入下水から検出されたSaV遺伝子コピー数はそれぞれ $2.9 \times 10^7$  copies/L、 $9.3 \times 10^7$  copies/Lであった。同程度の小児科定点における感染性胃腸炎患者報告数のピークが確認された時期に流入下水から検出されたNoVG II群遺伝子コピー数が $1.2 \times 10^7$  copies/Lであることを考えると、検出された遺伝子コピー数に対して小児科定点あたりの患者報告数が少ないことから、SaVによる感染性胃腸炎はNoVG II群と比較すると現状の発生動向調査では探知されにくい可能性が示唆された。

#### E. 結論

2014/2015 シーズンから2018/2019 シーズンに県内で検出されたNoVの遺伝子型について比較した。その結果、G II.4が全てのシーズンを通じて最も多く検出された。一方、シーズンによってはG II.2、G II.17による流行も確認できた。

また、2018年1月から2018年12月にかけて流入下水中を対象にNoVおよびSaV遺伝子を定量的に検出した結果、流入下水中のNoVはほぼ通年検出され、特にNoVG II群の遺伝子濃度は小児科定点における感染性胃腸炎報告数の増加を反映していた。加えて、SaVもNoVと同様に通年検出され、2018年は昨年に引き続きNoVよりも高濃度で検出された。本調査より流入下水中のNoVをモニタリングすることで感染性胃腸炎流行の早期察知が可能であると考えられた。一方、SaVは検出された遺伝子コピー数に対して小児科定点あたりの患者報告数が少なく、病院受診に至らない散発事例や軽症例、または不顕性感染が多い可能性が示唆されることから、流入下水による流行の早期察知の指標に関してはさらなる検討が必要である。

#### 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 ウイルス遺伝子の検出方法

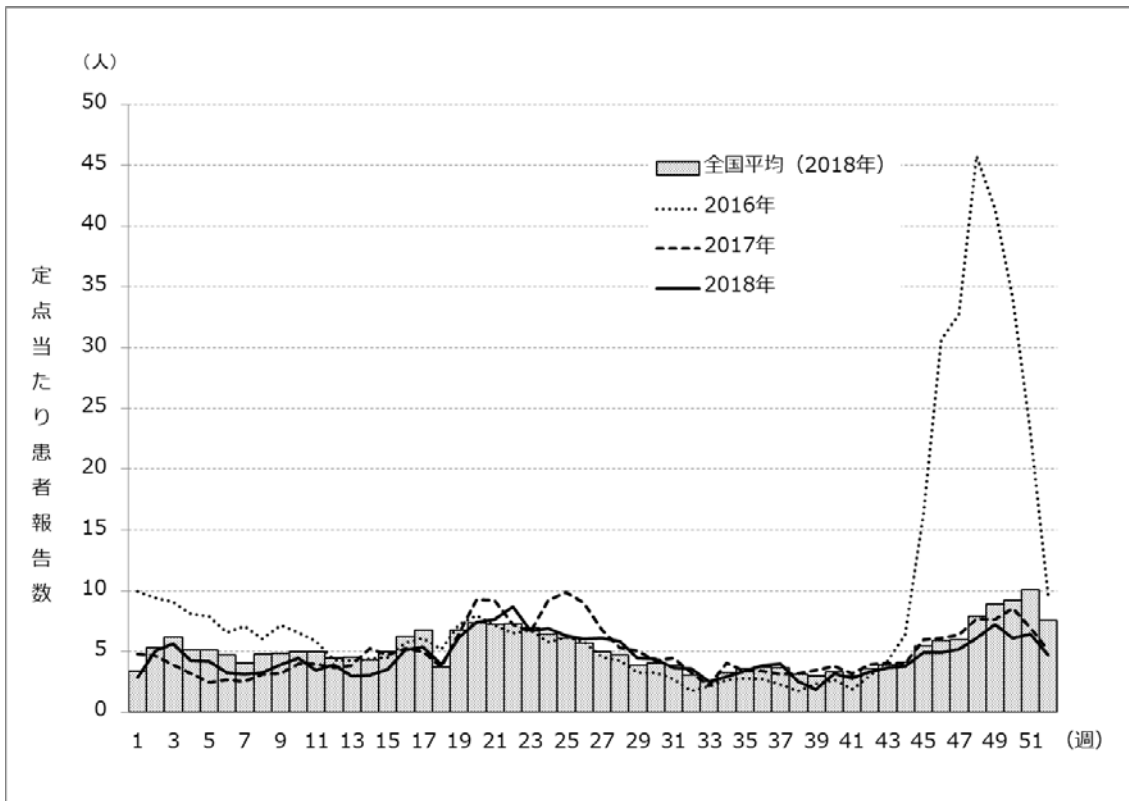


図2 小児科定点における感染性胃腸炎患者報告数

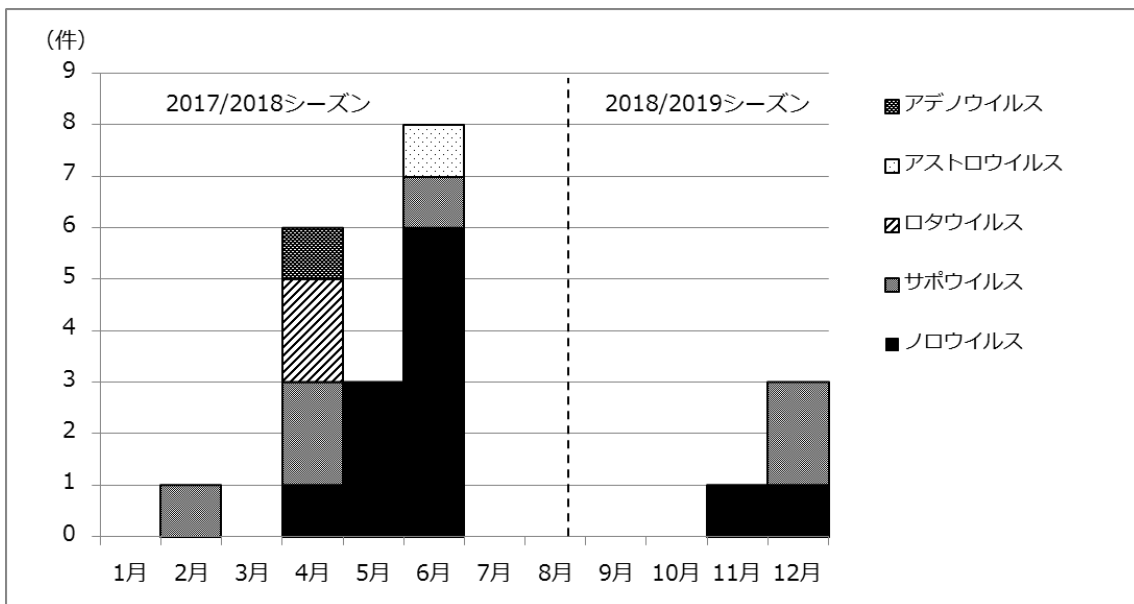


図3 県内での感染性胃腸炎集団発生事例数



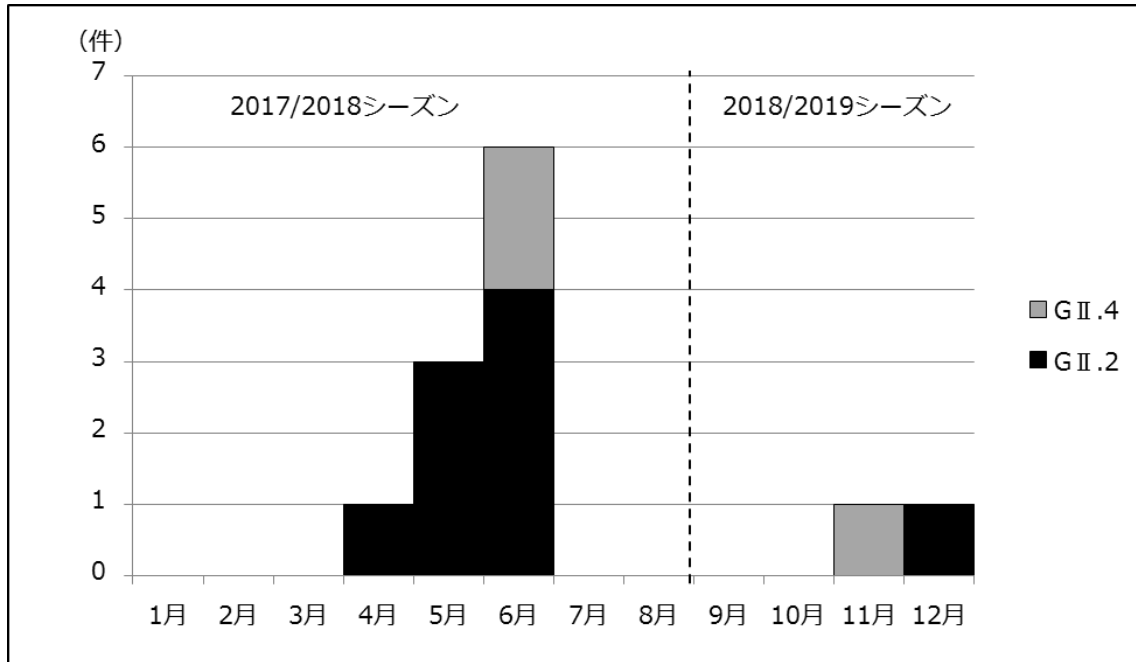


図4 県内で発生した感染性胃腸炎集団発生事例のNoV遺伝子型

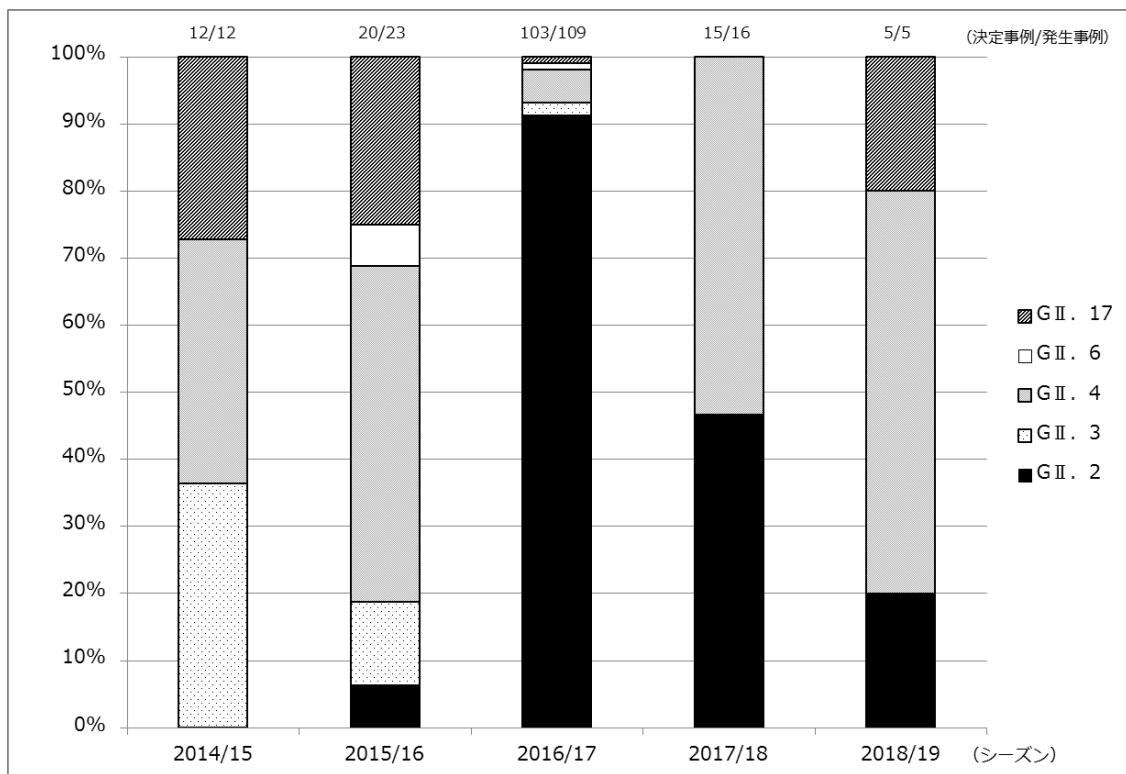


図5 過去5シーズンのNoVGI.2群遺伝子型の割合

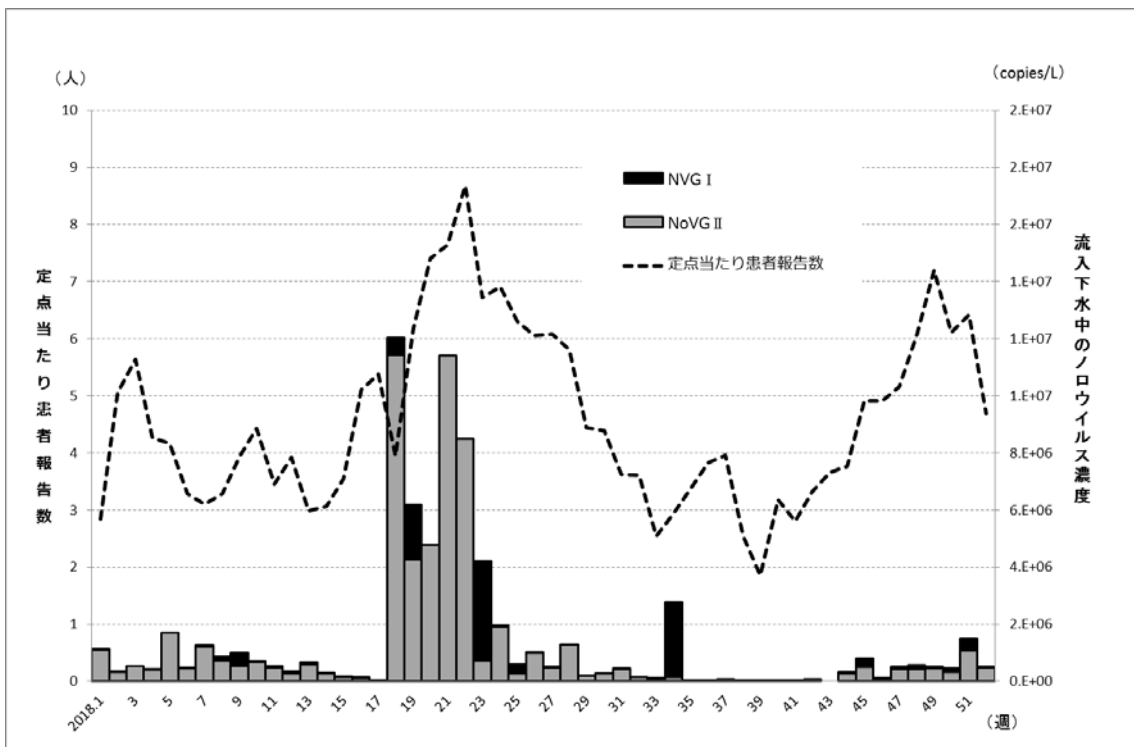


図6 小児科定点における感染性胃腸炎患者報告数と流入下水中のNoV濃度推移

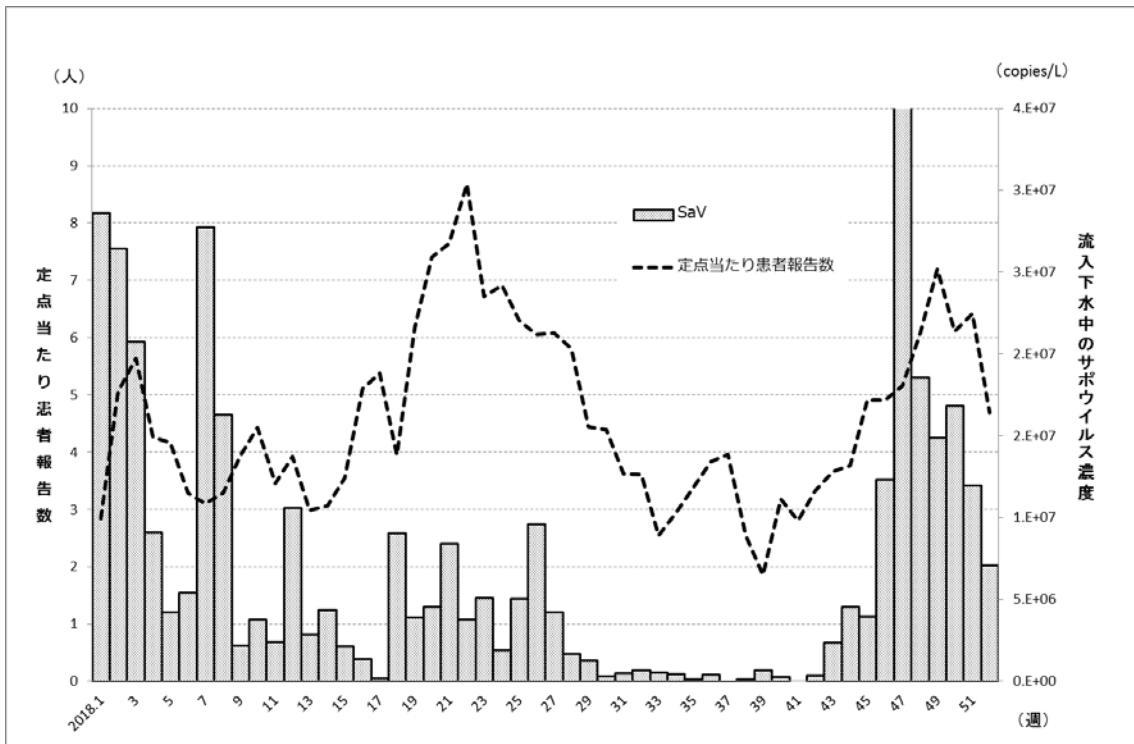


図7 小児科定点における感染性胃腸炎患者報告数と流入下水中のSaV濃度推移

平成 30 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

## 水溶性高分子ポリマーコーティングによる 手指汚染の水洗いによる簡易除去 (第三報)

研究協力者	田村 務	新潟県保健環境科学研究所
	西田 晶子	
	渡部 香	
	広川 智香	
	新井 礼子	
研究分担者	上間 匡	国立医薬品食品衛生研究所

### 研究要旨

調理従事者による食品汚染が食中毒の原因となることが多く、手指の衛生管理が重要な課題である。ノロウイルスの代替ウイルスとして、大腸菌の MS2 ファージを使用して、汚染前の水溶性高分子ポリマーによる手指のコーティングが、手洗い後に手に残存するウイルス汚染を減らす効果があるかどうかを、10 人の被験者の協力のもと実際の手洗いを模して有効性を評価した。

被験者の両手を  $8 \times 10^7$  個のファージで汚染し、次の 4 つの試験、A: 手洗い無し、B: 水で手洗い、C: ハンドソープによる手洗い、D: 3%カルボキシメチルセルロースの 45%エタノール液 (CMC 液) によるコーティング後にファージで汚染し水洗い、を実施して、両手に残ったファージをグローブジュース法で回収し、回収したバッファー中のファージ濃度を定量した。回収液中のファージ濃度の平均は、A:  $6.6 \log_{10} \text{pfu/ml}$ 、B:  $5.5 \log_{10} \text{pfu/ml}$ 、C:  $4.7 \log_{10} \text{pfu/ml}$ 、D:  $4.5 \log_{10} \text{pfu/ml}$  で、C と D に有意差は無いものの D が最も濃度が低かった。

CMC 液によるコーティングを実施して水洗いする方法が、最も手に残るファージ量が少なく、トイレの前に手指にこれらのコーティング剤を塗布することで、トイレ後の手洗いにおいて、手指を汚染したウイルスを効率的に洗い流すことができると考えられた。

### A. 研究目的

調理従事者等からの食品の汚染は手指を介して汚染することが多いと考えられ、

厳重な手洗いの方法が周知されている。

しかし推奨されている手洗い方法は時間や手間を要し、それを日々実践すること

は容易ではない。

手指がウイルスに汚染される機会として最も多いのはトイレと考えられ、特に自分のお尻を拭く際に手指を汚すことが多いと考えられる。

お尻を拭く作業を汚染作業と考え、その前に手袋をして行くと手を汚すことが無いが、手袋の着脱に手間がかかり、汎用的ではない。

そこで、トイレに入る前に手指を水溶性ポリマーでコーティングして、トイレの後に手を洗えば、ポリマーとともに簡単にウイルスを含む汚れを落とすことができるのではないかと考え、検討を行った。

昨年度の研究では、3人の手を片手ずつサンプルとして6検体で比較したため、比較的バラツキが少なかった。人の手は個々にかなり異なることから、バラツキを含めて比較することとした。そこで、今年度は10人の両手を用いて、大腸菌MS2ファージをノロウイルスの代替ウイルスとして汚染ウイルスに使用し、カルボキシメチルセルロースナトリウムによるコーティングの手洗いにおける有効性を検討した。

## B. 研究方法

### 1. 材料

使用したファージの調製

ノロウイルスの代替ウイルスとして、*Escherichia coli* phage MS2 (NBRC 102619株)を使用した。宿主菌株は、*Escherichia coli* (以下、*E. coli*) (NBRC 106373株)を使用した。

*E. coli* の増殖用培地として、Bacto Trypton (DIFCO) ; 1g、D(+)グルコース ;

0.1g、NaCl ; 0.8g、CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O ; 0.03g、MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O ; 0.015g を蒸留水 100ml に溶解し、121℃15分オートクレーブ滅菌したブイヨン (以下、トリプトブイヨン) を使用した。

トリプトブイヨンに *E. coli* を接種して約6時間程度培養後、MS2ファージを接種して一晩培養した。ファージを精製して0.5%BSA加PBS(-)で、 $1 \times 10^6$  pfu/ $\mu$ l に希釈して塗布用原液とした。

### 2. 方法1 ダブルレイヤーアガー法によるプラーク形成によるファージの定量

トリプトブイヨンに寒天を1%濃度に加えた培地約10mlをシャーレに入れて下層平板を作製した。下層平板に被検液を入れ、更に約6時間程度トリプトブイヨンで培養した *E. coli* 菌液100 $\mu$ lを入れた。ここに、寒天濃度0.5~0.6%のトリプトブイヨン寒天培地約10mlを入れて混釈した。固化した培地を安全キャビネット内で乾燥後、37℃オーバーナイトで培養し、形成されたプラーク数をカウントした。なお、全てのファージの定量はシャーレを2枚使用して、その平均をデータとした。

### 3. 方法2 被験者の手の前処理とMS2ファージの汚染

手指の消毒剤や手洗い剤の有効性を評価するASTM国際的な方法 ; ASTM E2011-13 : Standard Test Method for Evaluation of Hygienic Handwash and Handrub Formulations for Virus-Eliminating Activity Using the Entire Hand を参考に、方法2以降の試験を実施した。

被験者 14 人中、試験に参加できる 10 人の両手を使用して実験を行った。試験前の手の準備として、①抗菌性物質を含まない石鹼で手を洗い、1 分以上流水で流した。②ペーパータオルで水分を除去し、乾燥させた。③1.5ml の 70%エタノールを手にとり、両手全面に広げて十分乾燥させたのち、試験を行った。

ファージ液の塗布方法は、片手あたり、 $1 \times 10^6$  pfu/ $\mu$ l のファージ液  $40 \mu$ l (合計  $4 \times 10^7$  pfu) を塗布した。塗布は、手指の汚染の実態を考慮して、マルチチャンネルピペットに 4 本のチップを装着して  $2 \mu$ l にセットし、手の指と平に 5 か所塗布したのち、それぞれの手をもんで手の平面に広げて乾燥させた。

#### 4. 方法 3 グローブジュース法 (以下、GJ 法) による手からのファージの回収

クリーンルーム用の高度清浄滅菌アセトニトリル手袋 (M サイズ) に、0.1% Tween 20, 1% ペプトン加 PBS(-) を 40ml 入れ、これを被験者の両手に装着し、輪ゴムで手首を止めた。1 分間両手をよくもんだ後手袋を外し、左右の手袋のバッファを混合した後、バッファを 50ml 遠沈管に回収した。回収したバッファの一部を  $0.22 \mu$ m のフィルターで濾過し、原液あるいは 1% ペプトン加 PBS(-) で適宜 10 倍段階希釈してプラーク法の被検液とした。

#### 5. 方法 4 MS2 ファージによる手指汚染と手洗い試験

A から D の試験を図 3 のとおり実施した。各試験は、1 日 1 回として、1 日以上

の間をあけて行った。手洗いは、 $25^\circ\text{C}$  の水温で、1 分間で 2L の水流で 20 秒洗浄した。

試験 A: ファージ液を手塗布し乾燥後 GJ 法で回収した。

試験 B: ファージ液を手塗布後、水で手洗いしペーパータオルで水分を除去した後に GJ 法で回収した。

試験 C: ファージ液を手塗布後、市販の泡状ハンドソープ 1 押しを片手に付け、少量の水とともに両手全体をこすった後水で手洗いし、ペーパータオルで水分を除去した後 GJ 法で回収した。

試験 D: 3%カルボキシメチルセルロース・45%エタノール液 (以下 CMC 液) 1.5ml を片手にとり、両手全面に広げて乾燥させた。ファージ液を手塗布して乾燥後、手洗いし、ペーパータオルで水分を除去したのちに GJ 法で回収した。

(倫理面への配慮)

手指汚染の実験に参加した 14 名に、MS2 ファージはヒトへの感染力は無いことを説明し、承諾を得たうえで実験した。

### C. 研究結果

A から D の各試験で、GJ 法により両手から回収された 80ml のバッファ中の総ファージ量の 10 人の平均を図 1 にまとめた。毎回の実験で、両手に接種したファージの総量を再定量したところ、平均  $7.9 \log_{10}$  pfu から  $8 \log_{10}$  pfu であった。

ファージを塗布後すぐに GJ 法で両手から回収した試験 A では、回収ファージ量の 10 人の平均は  $6.6 \log_{10}$  pfu で、試験 B

の水洗いのみでは、回収ファージ量は平均  $5.5 \log_{10} \text{pfu}$  と 1 オーダー低かった。

試験 C のハンドソープ洗浄後に、回収されたファージ量は平均  $4.7 \log_{10} \text{pfu}$  と試験 B の水洗いのみより約 1 オーダー低く、有意差があった。

試験 D は、洗浄後に回収されたファージ量が最も低く、平均  $4.4 \log_{10} \text{pfu}$  で、試験 B とは有意差があったが試験 C との有意差は無かった。

#### D. 考察

人の手は形、皮膚の性状、大きさなど個人によってかなり差があること、手の洗い方も個人さがあることから、これらのバラツキの要因を加え、実際の手洗いを模した際の水溶性ポリマーコーティングによるウイルス洗浄効果の有効性を確認するため、1 日 1 試験を 14 人から 10 人を選んで実験を繰り返し実施した。

試験 C のハンドソープ手洗いと試験 D のコーティング法で、手洗い後に指から回収されたファージ量に有意差は無かったが、コーティングを実施した試験 D の平均値が最も低かった。このことから、コーティング法はハンドソープによる手洗いと同等のウイルス汚染後の洗浄による残存ウイルス低減効果があると考えられた。コーティング法とハンドソープの併用でより高い汚染ウイルスの低減効果が期待できると思われる。

トイレに入る前にコーティングすることで、トイレ中の手指汚染を水洗いで簡易に除去することができ、食品取扱者の安全対策の一法として有効な方法と考えられる。CMC を使用すると、水洗いの際に

粘性が戻るため、よく水洗いしなければならぬと意識するとともに、多少の残留があっても食品添加物であることから、安全性の面では問題無いと考えられた。

エタノール手指消毒薬と同様な感覚で使用でき、少量の水流と短時間でウイルス汚染の低減効果があることから、日常の糞口感染経路の抑制につながると考えられる。

#### E. 結論

CMC 液による手指のコーティング法は、手全体を用いて 10 人の個人差があったとしても、ハンドソープを用いた手洗と同等のファージ汚染の低減効果があることが確認された。

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
無し
2. 学会発表

第 39 回日本食品微生物学会学術総会で「水溶性高分子ポリマーコーティングによる手指汚染の水洗いによる簡易除去」をテーマとして発表した。

#### 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

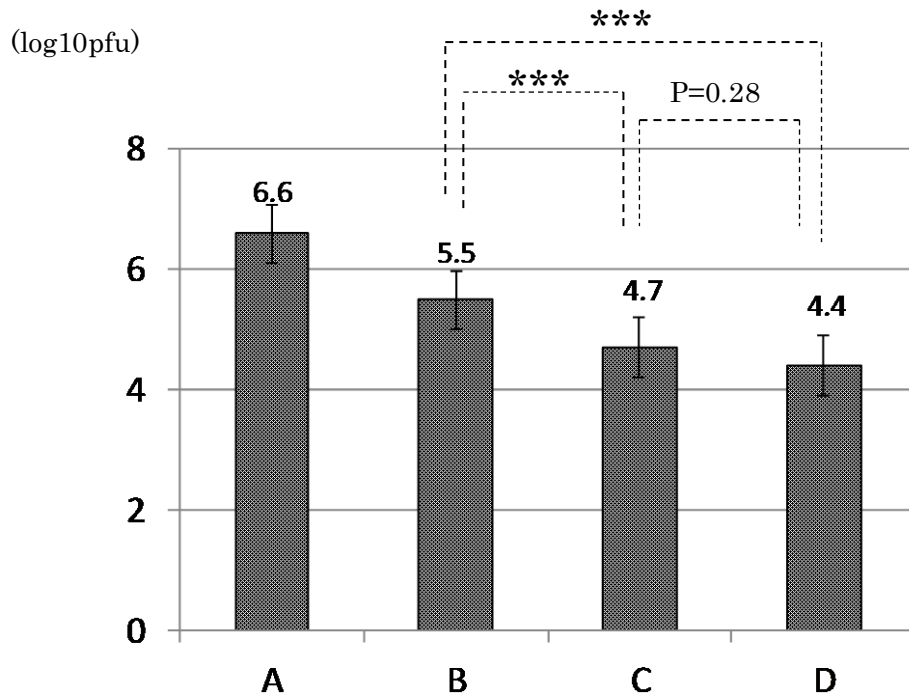


図1 手全体を使用した実験における GJ 法による残存ファージの回収量の比較

両手全体で約 8 log<sub>10</sub>pfu のファージを塗布し、A から D の実験後に GJ 法で手に残存したファージの総回収量をグラフに示した。

\*\*\* : p<0.001

A : ファージ液を手に塗布し乾燥、B : ファージ液を手に塗布後、水で手洗い

C : ファージ液を手に塗布して乾燥后市販の泡状ハンドソープで手洗い

D : カルボキシメチルセルロースによるコーティング後ファージ液を手に塗布して乾燥後手洗い

平成 30 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

Nested リアルタイム PCR を用いた食品および拭き取りからの  
ノロウイルス検出率の向上

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	宗村 佳子	東京都健康安全研究センター
研究協力者	浅倉 弘幸	東京都健康安全研究センター
研究協力者	小田 真悠子	東京都健康安全研究センター
研究協力者	新開 敬行	東京都健康安全研究センター
研究分担者	上間 匡	国立医薬品食品衛生研究所

## 研究要旨

2016 および 2017 年度におけるノロウイルス (NoV) 食中毒 (疑いを含む) 事例の調査で搬入された食品と拭き取り 1,735 検体を対象に、nested リアルタイム PCR を実施した。その結果、87 検体が Nested リアルタイム PCR で NoV 陽性となった。87 検体の中で、41 検体は通常のリアルタイム PCR では未検出であった。食中毒事例における原因食品および感染経路の究明のためには、食品や拭き取り検体に対して nested リアルタイム PCR による検査を実施することが有用であると考えられた。

### A. 研究目的

ノロウイルス (NoV) による食中毒の調査では、食品や施設の拭き取り検体についても NoV 検査を実施し、感染源や感染経路の究明が行われる。しかしながら、これらの検体に含まれる NoV 量は微量であるため検出し難い。我々は、より効率的に NoV を検出するため、リアルタイム PCR で低い定量値を示した検体については、確認検査として Nested リアルタイム PCR を実施している。本研究では、通常のリアルタイム PCR の結果に関わらず、全ての食品や拭き取りに対して Nested リ

アルタイム PCR を実施することで、NoV 検出率が向上するかどうかを検討した。

### B. 研究方法

#### 1. 材料

2016 および 2017 年度において、NoV 陽性となった食中毒 (疑いを含む) 事例の調査で搬入された食品と拭き取り 1,735 検体 (食品 786 検体、拭き取り 949 検体) を材料とした。

#### 2. Nested リアルタイム PCR

1st PCR のプライマーは、G I 用に COG1F/G1SKR、G II 用に COG2F/G2SKR を用



いた。反応条件は 94°C 3 分の後、94°C 1 分、50°C 1 分、72°C 2 分を 35 回繰り返す、最終伸長反応は 72°C 15 分とした。得られた PCR 産物 5 $\mu$ L を滅菌蒸留水 45 $\mu$ L で 10 倍に希釈し、リアルタイム PCR の試料とした。

リアルタイム PCR は、厚生労働省通知（平成 19 年 5 月 14 日付け食安監発第 0514004 号）に準拠して行った。

### 3. 遺伝子型分類

N/S 領域の塩基配列をダイレクトシーケンシング法により決定し、Norovirus Genotyping Tool Version 2.0 により遺伝子型を分類した。

（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 リアルタイム PCR の結果

1,735 検体中 87 検体が Nested リアルタイム PCR で NoV 陽性となった。陽性となった検体の内訳は、食品が 36 検体（二枚貝 19 検体、一般食品 9 検体）、拭き取りが 61 検体（トイレ関連 51 検体、調理場関連 8 検体、その他 2 検体）であった。

本研究の結果と、通常検査時に実施したリアルタイム PCR の結果を比較した（図）。Nested リアルタイム PCR が陽性であった 87 検体の中で、通常のリアルタイム PCR で実測値 10 コピー以上の値を示したものは 46 検体であり、その内訳は食品が 5 検体（二枚貝 4 検体、一般食品 1 検体）、拭き取りが 41 検体（トイレ関連 37 検体、調理場関連 3 検体、その他 1 検体）であった。一方、通常のリアルタイム PCR

では未検出であったものは 41 検体であり、内訳は食品が 21 検体（二枚貝 15 検体、一般食品 6 検体）、拭き取りが 20 検体（トイレ関連 14 検体、調理場関連 5 検体、その他 1 検体）であった。

### 2. NoV の遺伝子型別

通常のリアルタイム PCR では 10 コピー未満で、Nested リアルタイム PCR では陽性となった 41 検体の遺伝子型分類を実施し、同一事例の患者および従事者由来株との塩基配列を比較した（表 1、2）。

食品 21 検体は、全ての検体について 2ndPCR で増幅が確認され、一般食品 6 検体については、患者および従事者由来株と遺伝子型および塩基配列が一致した。一方、二枚貝については、複数の遺伝子型が混在していることにより解析不能であったものが 15 検体中 7 検体確認された。また、患者と遺伝子型が一致しなかったものが 2 検体であった。6 検体については、患者由来株と塩基配列が一致した。

拭き取り 20 検体中 1 検体は、2ndPCR で増幅が確認できなかった。19 検体については増幅が確認できたが、二枚貝が関連した事例（事例 B および I）の検体については、解析不能もしくは患者由来株と遺伝子型が一致しないという結果であった。それ以外の検体については、患者および従事者由来株と遺伝子型が一致し、塩基配列の一致率は 99.7~100%であった。

## D. 考察

食品および拭き取りに含まれる NoV 量は微量であることに加え、食品検体については食品由来成分が遺伝子検査を阻害

することが知られている。そのため、通常のリアルタイム PCR では微量な NoV を検出することが困難である場合もある。今回の検討では、通常のリアルタイム PCR では未検出であっても、Nested リアルタイム PCR を実施することで陽性と判定される検体が存在することが明らかとなった。通常のリアルタイム PCR でも陽性となる検体には、トイレ関連の拭き取りが多く、これらの検体には比較的多量の NoV が含まれていると考えられる。一方で、通常のリアルタイム PCR では未検出で、Nested リアルタイム PCR では陽性となる検体には、二枚貝や一般食品、調理場関連の拭き取りの割合が多くなり、これらの検体に含まれる NoV 量はごく微量であると考えられた。残品や検食などの一般食品や調理場関連の拭き取りは、食中毒調査における原因食品や感染経路の特定する直接的な証拠となることから、これらの検体から NoV を検出することは極めて重要である。今後、食品や拭き取り検体からより確実に NoV を検出していくためには、nested リアルタイム PCR による検査を積極的に実施していくことが望ましいと考えられた。

## E. 結論

2016 および 2017 年度に NoV 陽性となった食中毒（疑いを含む）事例の食品と拭き取り 1,735 検体について、nested リアルタイム PCR を実施したところ、87 検体が陽性となり、その中で 41 検体は通常のリアルタイム PCR では未検出であった。食中毒調査において、原因食品および感染経路の究明のために食品や拭き取りの

NoV 検査を実施する際には、nested リアルタイム PCR による検査を実施することが望ましいと考えられた。

## 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

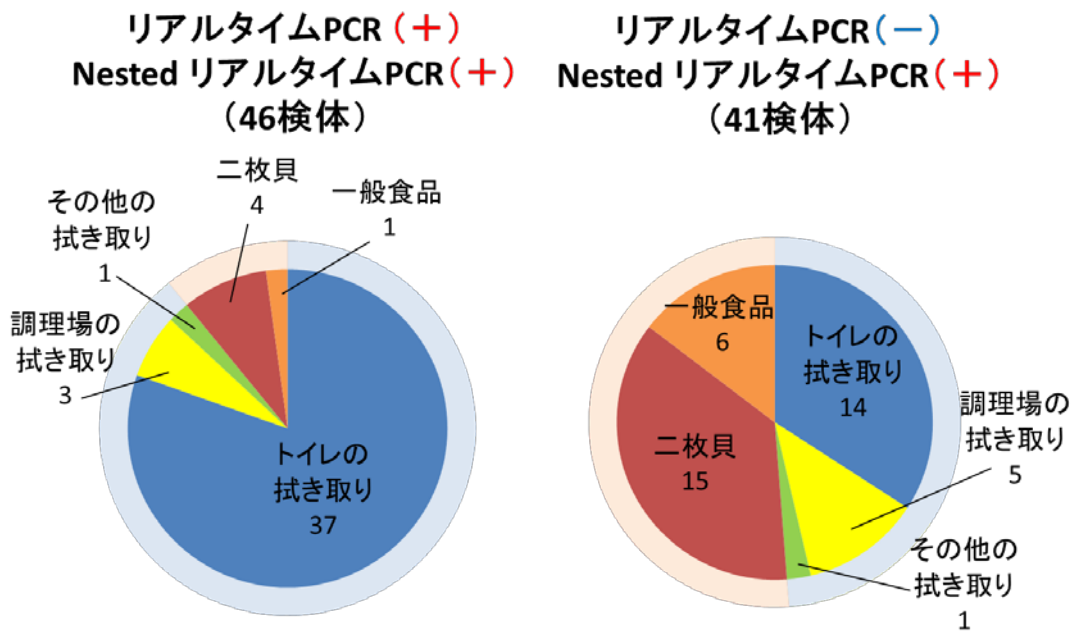


図 Nested リアルタイム PCR とリアルタイム PCR の比較

表 1 Nested リアルタイム PCR で陽性となった食品の遺伝子型 (21 検体)

事例	検体名	遺伝子型	患者 遺伝子型	従事者 遺伝子型
A	寿司(酢飯)	G II . 17	G II . 17	—
D	生カキ	解析不可	G II . 17	G II . 17
K	生食用カキ3個	G II . 17	G II . 2	—
M	加熱用カキ	解析不可	G II . 17	—
M	生食用カキ(O県産)	解析不可	G II . 17	—
O	冷凍カキフライ	G II . 17	G II . 17	—
P	白菜の塩漬け	G II . 4	G II . 4	G II . 4
P	キャベツ千切り	G II . 4	G II . 4	G II . 4
Q	ホンビノス貝	解析不可	G II . 17	—
S	はまぐり	G II . 17	G II . 17	—
S	かき	G II . 17	G II . 17	—
T	マカロニサラダ	G II . 17	G II . 17	G II . 17
U	生ガキ(H県産)	G II . 17	G II . 8	—
X	カキ	解析不可	G II . 17	—
Y	生カキ(M産)	解析不可	G I . 7 G II . 17	—
Y	生カキ(S産)	解析不可	G I . 7 G II . 17	—
Y	生カキ(Z産)	G II . 17	G I . 7 G II . 17	—
Z	殻付き生ガキ	G II . 17	G II . 17	—
AA	生カキ(H県)	G II . 17	G II . 17	—
AB	冷菜(クラゲ、キュウリ細切り、キュウリ漬物)	G II . 17	G II . 17	G II . 17
AB	冷菜(豆腐ハム、砂肝、魚揚げ物)	G II . 17	G II . 17	G II . 17

表2 Nested リアルタイム PCR で陽性となった拭き取りの遺伝子型 (20 検体)

事例	検体名	遺伝子型	患者 遺伝子型	従事者 遺伝子型
B	トイレドア取っ手内側	GII.3	GII.3	GII.2
C	スリッパ	GII.2	GII.2	—
E	便器内	GII.2	GII.2	GII.2
F	ベット表面(おむつ替え)	GII.2	GII.2	—
G	カット野菜用冷蔵ショーケースとって	GII.2	GII.2	GII.2
H	洋式トイレの便座	増幅不可	GII.2	GII.2
I	刺身調理台上部	解析不可	—	GI.3 GII.2
I	男性用洋便器フチ	GI.3	—	GI.3 GII.2
J	トイレ従業員男 B1	GII.2	GII.2	GII.2
L	従事者用トイレ(ドアノブ、手洗器、便座)	GII.2	GII.2	GII.2
N	トイレ入口フロアマット	GII.17	GII.17	—
P	二槽シンク(右側)	GII.4	GII.4	GII.4
P	手洗い器(調理場)	GII.4	GII.4	GII.4
P	トイレ(ドアノブ、ロータンク、レバー)	GII.4	GII.4	GII.4
R	従業員用トイレ便座裏	GII.3	—	GII.3
T	1階トイレ床	GII.17	GII.17	GII.17
V	男性用トイレ便座裏	GII.17	GII.17	GII.17
W	トイレ便器内、便座裏	GII.17	GII.17	—
AB	トイレ手洗蛇口	GII.17	GII.17	GII.17
AB	シンク回り壁面	GII.17	GII.17	GII.17

平成 30 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

### 川崎市における二枚貝のノロウイルス検出状況

研究協力者	清水 智美	川崎市健康安全研究所
研究協力者	若菜 愛澄	川崎市健康安全研究所
研究協力者	清水 英明	川崎市健康安全研究所
研究分担者	上間 匡	国立医薬品食品衛生研究所

#### 研究要旨

川崎市内の河川に生息するシジミについてノロウイルス (NoV) 検査を行い、ヒトでの流行遺伝子型と比較し、関連性について調査した。2017 年 8 月、10 月、2018 年 2 月、6 月、8 月、10 月、11 月、12 月に採取したシジミ 156 検体中 51 検体から NoV が検出され、NoV 保有率 (陽性率) は 32.7%であった。

河川のシジミから検出された NoV GI 群と、ヒトから検出された NoV GI 群の遺伝子型や塩基配列は異なっていたため、シジミが保有する NoV GI 群はヒトでの流行と関連性が低いと考えられる。一方、GII 群では、河川のシジミから GII.2、GII.3、GII.4 及び GII.17 が検出され、近年のヒトにおける流行遺伝子型を反映する結果が得られた。また、河川のシジミから検出された NoV GI 群と GII 群の比率は 58.3 : 41.7 と、GI 群の方がやや優勢であったのに対し、ヒトにおいては 13.5 : 86.5 と、GII 群が多くを占めていた。これらのことから、GI 群では不顕性感染又は、当所では把握していない GI 群患者 (顕性) が発生していたことが推測される。対して GII 群では GI 群と比して顕性感染となる可能性が高いと考えられる。

今後も引き続き二枚貝が保有する NoV について調査し、長期間にわたりデータを蓄積するとともに、当市における NoV の流行状況について注視する必要があると考える。

#### A. 研究目的

ウイルス性食中毒は、ウイルスに汚染された食品を喫食することによって引き起こされる。ウイルスに汚染された河水や海水をろ過し、中腸腺中にウイルス

が蓄積・濃縮した二枚貝を、生食又は加熱不十分な状態で喫食することによる食中毒事例が、多数報告されている。

本研究では、二枚貝のノロウイルス (NoV) 保有率や保有遺伝子型の把握を目

的とし、川崎市内の河川に生息するシジミについてNoV検査を行った。また、ヒトでの流行遺伝子型と比較を行い、関連性について調査した。

## B. 研究方法

### 1. 材料

#### (1) 市内の河川に生息するシジミ

市内河川の干潟にてシジミを採取した。2017年8月、10月、及び2018年2月に採取したものは毎月12検体ずつ、2018年6月、8月、10月、11月及び12月に採取したものは各月24検体ずつNoVの検査を行った(156検体)。

#### (2) 市内におけるNoV検出状況

2013年9月から2018年12月までの期間に当所においてNoV陽性となった食中毒(疑い含む)及び感染症集団発生事例を対象とした(197事例)。

### 2. 二枚貝からのNoV検出

#### (1) 二枚貝からのウイルス濃縮

二枚貝1個体を1検体とした。食品のウイルス標準試験法検討委員会「二枚貝(カキ)からのウイルスの濃縮法(ポリエチレングリコールによる濃縮法)」を参考に、二枚貝の中腸腺を取り出し、9倍量の $\alpha$ -アミラーゼ(和光純薬)/PBS液(2.8 mg/mL)を加えて10%乳剤を作製した。37°Cに設定した恒温振とう器を用いて1時間消化を行ったのち、10,000 rpm、20分間冷却遠心した。その後は、厚生労働省通知法「貝の中腸腺を用いる方法(ポリエチレングリコールによる濃縮方法)」に準じ、遠心上清にポリエチレングリコール6,000を8%、NaClを2.1 g/100 mLになるように加えて軽く攪拌し、4°Cで一

晩静置し、10,000 rpm、20分間冷却遠心した沈渣を300~600  $\mu$ LのDDWで再浮遊させ濃縮した。

#### (2) NoVの検査

QIAamp Viral RNA mini Kit (QIAGEN)を用いてRNAを抽出し、Recombinant DNase I (TaKaRa)を用いてDNase処理を行い、PrimeScript® II 1st strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa)を用いた逆転写反応によってcDNAを合成した。Capsid N/S領域についてsemi nested PCR (1st: COG1F/G1SKR, COG2F/G2SKR, semi nested: G1SKF/G1SKR, G2SKF/G2SKR)を行い、陽性となった検体はダイレクトシーケンスによって塩基配列を解読し、Norovirus Genotyping Tool (<http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool>)を用いて遺伝子型を決定した。

#### (倫理面への配慮)

本研究の実施については、当所倫理審査委員会にて承認済みである(審査番号:29-4)。

## C. 研究結果

### 1. 河川のシジミにおけるNoV保有状況

156検体中51検体からNoVが検出され、NoV保有率(陽性率)は32.7%となった(表1)。2018年2月から12月にかけて、陽性率の増加がみられた(図1)。

陽性検体の中で最も多く検出された遺伝子型がGI.4で、41.2%を占めた(21/51検体)。次いで多く検出されたのがGII.17(10/51検体、19.6%)であり、GII.2(8/51検体、15.7%)、GI.3(6/51検体、11.8%)、GII.3(6/51検体、11.8%)と続いた。

河川のシジミから検出された NoV GI 群と GII 群の比率は 58.3 : 41.7 と、GI 群の方がやや優勢であった。陽性となった 51 検体中、21 検体 (41.2%) で GI 群と GII 群の両方が検出された。

## 2. 市内における NoV 検出状況

2013/14 シーズンの主流遺伝子型は GII.4 (51.0%) 及び GII.6 (27.5%)、2014/15 及び 2015/16 シーズンでは GII.4 (34.3%, 24.4%) 及び GII.17 (23.9%, 34.1%) が主流であった。2016/17 及び 2017/18 シーズンにおいては GII.2 (60.7%, 42.3%) が最も多く検出された。2018/19 シーズンは、9 月から 12 月までの期間において GII.2 と GII.4 が各 3 事例 (各 50.0%) で検出された (図 2)。対象期間中に最も多く検出されたのは GII.4 で、32.1% を占めた。次いで多かったのが GII.17 (19.3%)、GII.2 (17.0%) であり、これらの遺伝子型が近年の主流と言える。

NoV 陽性となった 197 事例における GI 群と GII 群の検出比率は 13.5 : 86.5 であり、GII 群が多くを占めた。

## D. 考察

河川のシジミについて、NoV GI 群に着目すると、最も多く検出された GI.4 (陽性検体中 41.2%) は、ヒトでは 2 事例のみ (1.0%) であった。次いでシジミから多く検出された GI.3 (11.8%) は、ヒトにおける陽性事例の 4.1% (8/197 事例)、GI 群陽性事例の中では 28.6% (8/28 事例) を占めていたが、シジミから検出された GI.3 とヒトから検出された GI.3 では塩基配列が明らかに異なっており (データ未公開)、ヒトに感染したものがシジミか

ら検出されたとは考えにくい。これらのことから、河川のシジミが保有している GI 群と、ヒトで流行している GI 群の関連性は低いと考えられる。一方、NoV GII 群については、河川のシジミから検出された遺伝子型が GII.17 (19.6%)、GII.2 (15.7%)、GII.3 (11.8%)、GII.4 (9.8%) と、近年のヒトにおける流行を反映していた。また、河川のシジミから検出された GI 群と GII 群の比率は GI 群の方がやや優勢であったのに対し、ヒトにおいては GII 群が多くを占めた。以上のことから、GI 群では不顕性感染又は、当所では把握していない GI 群患者 (顕性) が発生していたことが推測され、対して GII 群では GI 群と比して顕性感染となる可能性が高いと考えられる。

GII.4 において、ヒトから検出されたものと河川のシジミが保有していたものとで塩基配列が一致したものがあつたが、ヒトでの検出年月とシジミの採取年月が同じ場合と異なる場合があり、時期のずれも様々であり (図 3)、今回得られたデータのみで関係性を明らかにするのは難しかった。したがって、今後も引き続き二枚貝が保有する NoV について調査し、長期間にわたりデータを蓄積するとともに、当市における NoV の流行状況について注視する必要があると考える。

## E. 結論

- ・市内河川に生息するシジミの NoV 保有率 (陽性率) は 32.7% であつた。
- ・河川のシジミから最も多く検出された NoV GI.4 は、ヒトにおいてはほとんど検出がなく、他の GI 群の遺伝子型に着

目しても、ヒトにおける流行との関連性は低かった。

- ・ 河川のシジミから検出された NoV GII 群は、GII. 2、GII. 3、GII. 4 及び GII. 17 であり、ヒトでの主流遺伝子型と一致する結果となった。
- ・ GI 群では不顕性感染又は当所で把握していない患者が発生したことが推測され、GII 群では GI 群と比して顕性感染となる可能性が高いと考えられる。
- ・ 今後も定期的に二枚貝を採取し、データを蓄積する必要がある。

#### 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



表1 河川のシジミにおけるNoV検査結果(2017.8~2018.12)

採取年月	検体数	陽性数	陽性率	遺伝子型
2017.8	12	3	25.0%	GII.4 (×2検体)、 <u>GI.3とGII.17</u>
2017.10	12	3	25.0%	GI.3、GII.2、GII.4
2018.2	12	1	8.3%	<u>GI.3とGII.17</u>
2018.6	24	3	12.5%	GI.3、GII.2、GII.3
2018.8	24	5	20.8%	GI.6 (×2検体)、 <u>GI.3とGII.3</u> 、 <u>GI.6とGII.2</u> 、 <u>GI.6とGII.17</u>
2018.10	24	9	37.5%	GI.1、GII.3 (×2検体)、GII.17、 <u>GI.3とGII.17</u> 、 <u>GI.4とGII.4</u> 、 <u>GI.4とGII.17 (×2検体)</u> 、 <u>GI.6とGII.3</u>
2018.11	24	13	54.2%	GI.2、GI.4 (×3検体)、 <u>GI.5 (×3検体)</u> 、 <u>GI.2とGII.17</u> 、 <u>GI.4とGII.2 (×2検体)</u> 、 <u>GI.4とGII.3</u> 、 <u>GI.4とGII.17</u> 、 <u>GI.7とGII.17</u>
2018.12	24	14	58.3%	GI.2、GI.4 (×7検体)、GI not typed、 <u>GI.2とGII not typed</u> 、 <u>GI.4とGII.2 (×3検体)</u> 、 <u>GI.4とGII.4</u>
<b>Total</b>	<b>156</b>	<b>51</b>	<b>32.7%</b>	

※下線：1つの検体から混合検出

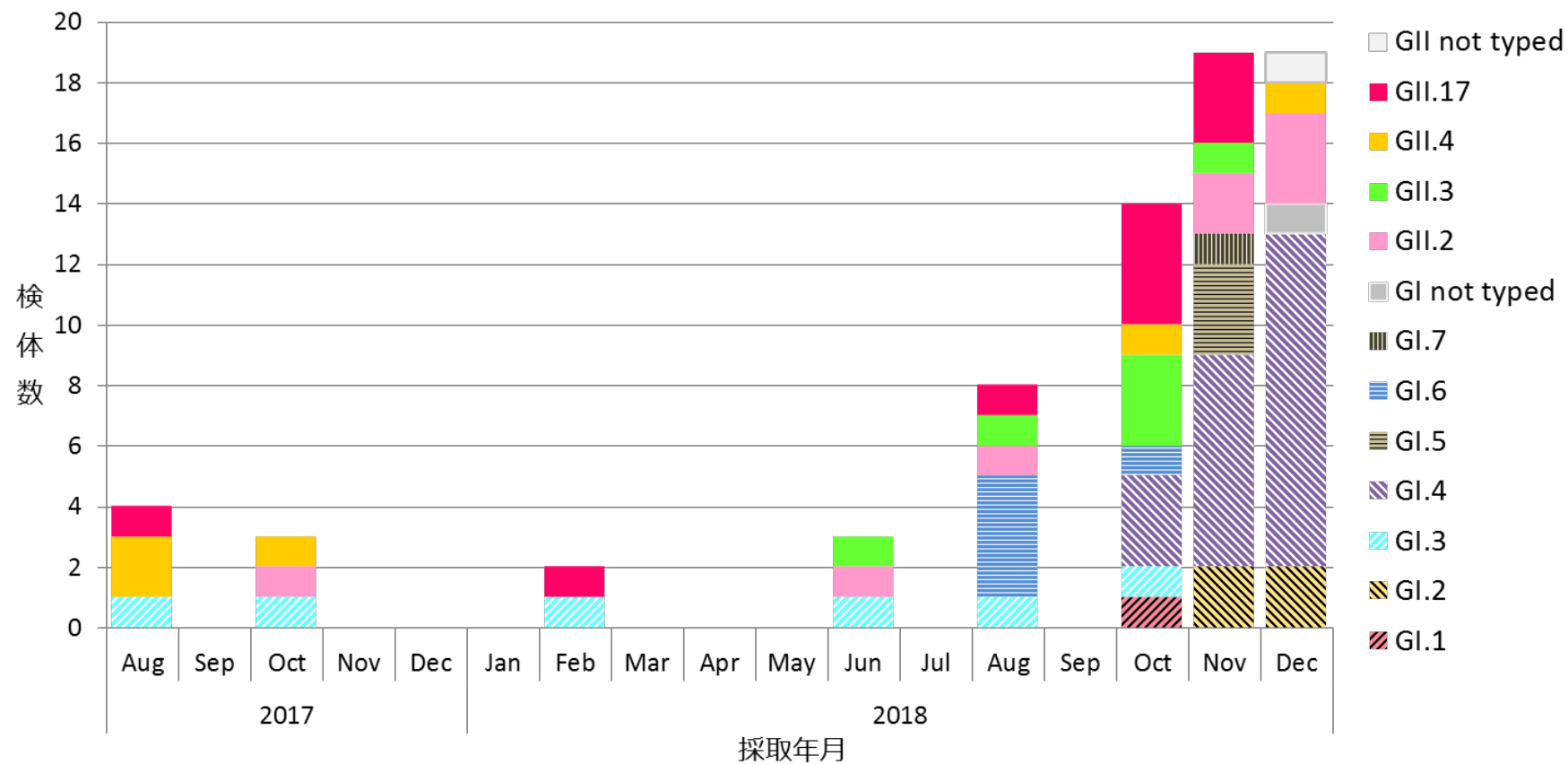
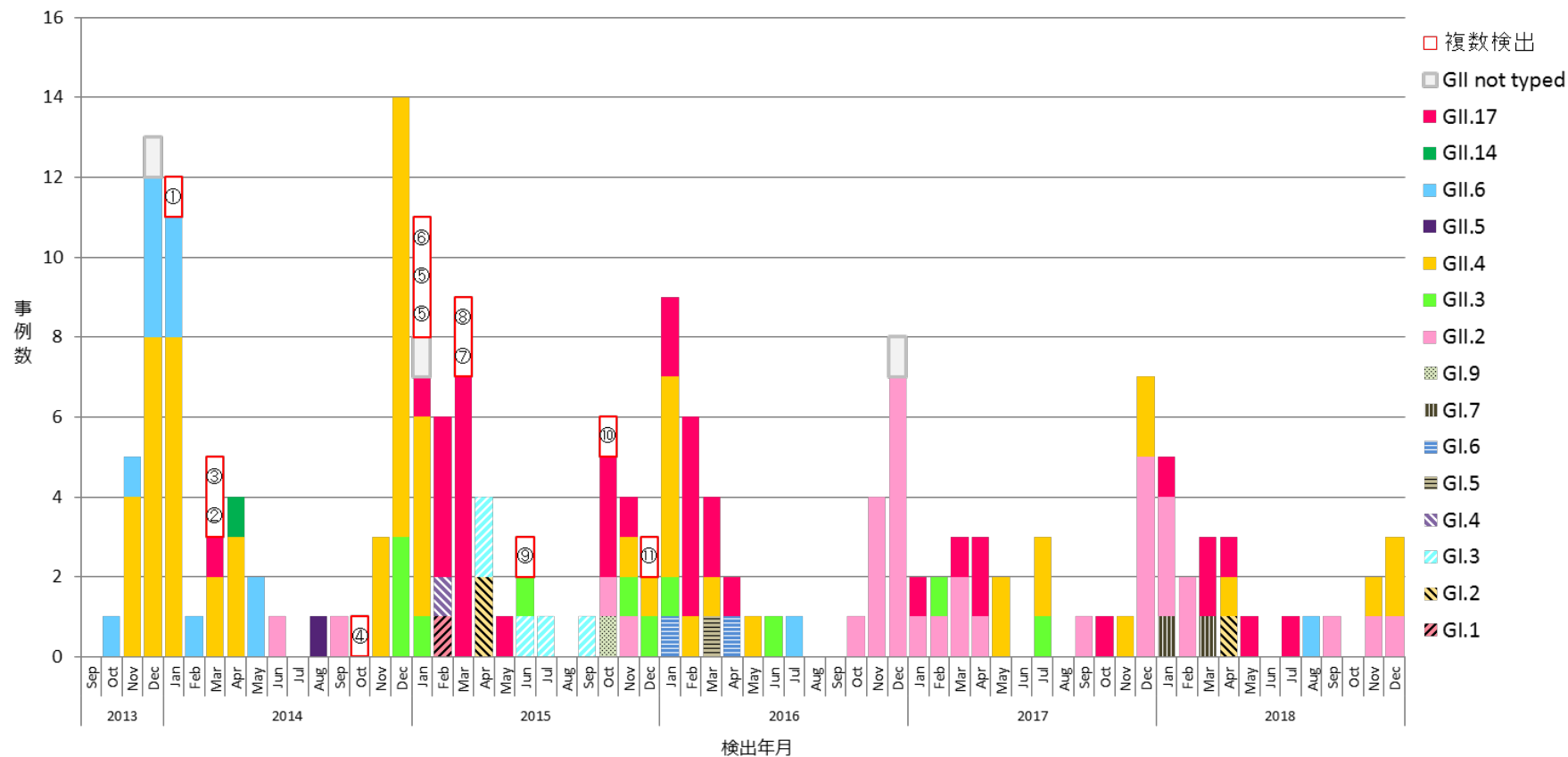


図1 市内河川のシジミにおけるNoV保有状況(2017.8~2018.12)

※混合検出されたものも積み上げて表示



※複数検出事例（1つの事例で複数の遺伝子型が検出された）  
 ①GI.6, GII.4 ②GI.2, GII.6 ③GI.3, GI.4, GI.6, GII.6 ④GI.3, GII.5 ⑤GI.2, GII.4 (2事例) ⑥GI.2, GII.2, GII.4  
 ⑦GI.2, GI.7, GII.13, GII.17 ⑧GI.2, GII.17 ⑨GI.2, GI.3, GI.6, GII.4, GII.13, GII.17 ⑩GI.8, GII.2, GII.21 ⑪GI.6, GI.9

図2 市内におけるNoV検出状況（2013.9～2018.12）

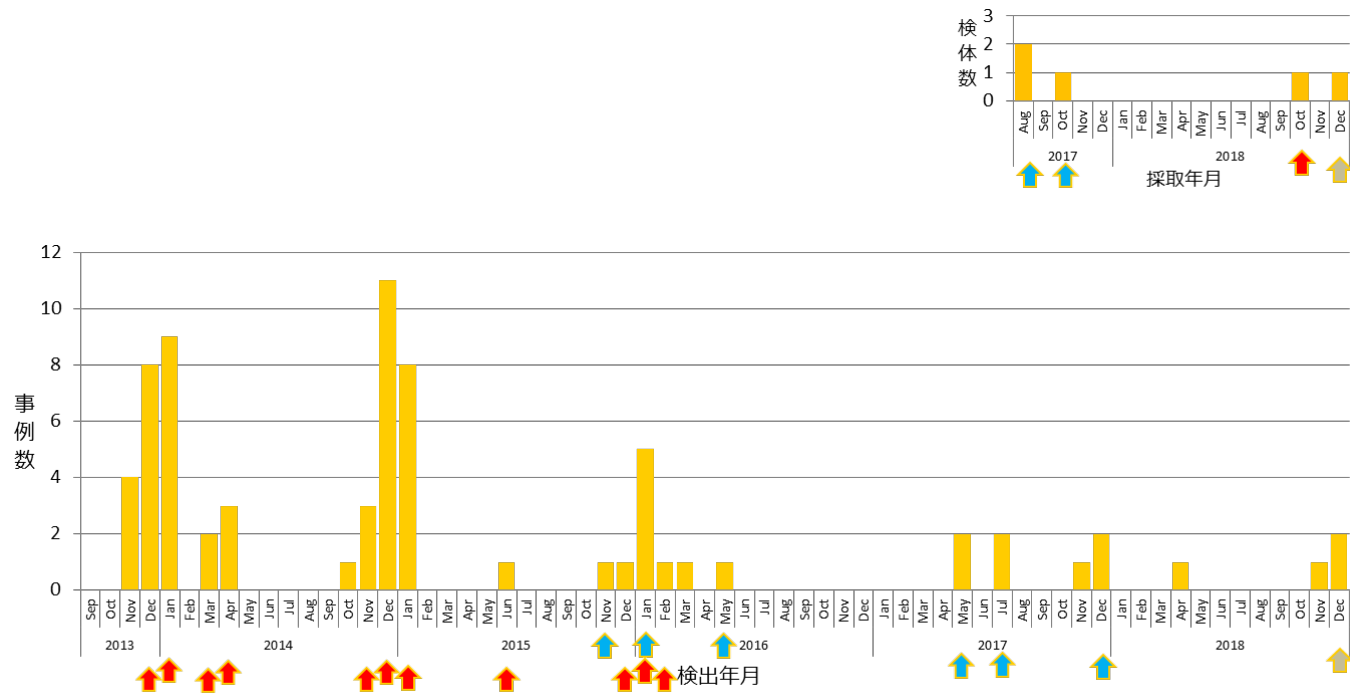


図3 市内河川のシジミにおけるNoV GII.4保有状況（上）及び市内ヒトにおけるNoV GII.4検出状況（下）  
（2013.9～2018.12）

※混合検出されたものも積み上げて表示

※N/S領域における塩基配列が一致した検体は同じ色の矢印で表示

平成 30 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

調理従事者および患者等から検出されたノロウイルスの遺伝子解析、  
胃腸炎事例から検出されたノロウイルスの分子疫学的解析および  
生食用カキのノロウイルス汚染調査

研究協力者	山元 誠司	大阪健康安全基盤研究所
研究協力者	改田 厚	大阪健康安全基盤研究所
研究協力者	平井 有紀	大阪健康安全基盤研究所
研究協力者	江川 和孝	大阪健康安全基盤研究所
研究協力者	馬場 孝	大阪健康安全基盤研究所
研究協力者	阿部 仁一郎	大阪健康安全基盤研究所
研究協力者	久保 英幸	大阪健康安全基盤研究所
研究協力者	入谷 展弘	大阪健康安全基盤研究所
研究分担者	上間 匡	国立医薬品食品衛生研究所

### 研究要旨

調理従事者からノロウイルス (NoV) が検出された食中毒 (疑いを含む) を対象に、患者由来 NoV と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 NoV の遺伝子型、塩基配列が一致した。特に患者の所在地が他自治体のみの場合でも、調理従事者と患者由来ウイルスの遺伝子型および塩基配列解析は感染経路解明につながる科学的根拠となった。

2018 年 1 月～12 月は大阪市において集団胃腸炎 36 事例が NoV 陽性となった。最も多く検出された遺伝子型は GII. 2 (18 事例、50.0%) であり、次いで GII. 6 (6 事例、16.7%)、GII. 17 (4 事例、11.1%) の順であった。GII. 2 の検出は食中毒事例およびヒト-ヒト (PP) 疑事例の両方でともに 50.0%を占めたのに対し、GII. 6 は PP 疑事例から、GII. 17 は食中毒事例から主に検出された。GII. 4 に起因する食中毒事例は認められなかった。

2018 年 12 月に市販されていた生食用カキに NoV および A 型肝炎ウイルス汚染は認められなかった。

#### A. 研究目的

ノロウイルス (NoV) 食中毒の中で、調理従事者から食品等への二次汚染が原因

であることは多い。今回、感染経路究明における調理従事者由来ウイルス遺伝子解析の有用性について検討した。

また、ヒトの NoV 流行状況や食品中の NoV 汚染状況を把握することは NoV による胃腸炎の流行予測や食中毒・集団感染の予防対策に重要である。本研究では NoV 流行を把握し、新たな変異ウイルスの出現を監視するために、集団胃腸炎事例の患者糞便および市販生食用カキについて NoV および A 型肝炎ウイルス (HAV) の検索および遺伝子型別を行った。

## B. 研究方法

### 1. 材料

1) 調理従事者由来 NoV の遺伝子解析  
2018 年 1 月～12 月の期間に、患者および原因施設調理従事者から NoV が検出された食中毒 (疑いを含む) 3 事例を対象とした。

2) 胃腸炎事例から検出された NoV の分子疫学的解析

2018 年 1 月～12 月に大阪市から当研究所へ検査依頼のあった食中毒 (疑いを含む) 20 事例、ヒトからヒトへ感染が広がったと推測された (PP 疑) 36 事例、計 56 の集団胃腸炎事例を対象とした。

3) 生食用カキの NoV および HAV 汚染調査

2018 年 12 月に市販されていた生食用カキ 3 ロットを NoV の検索に用いた。3 ロットは 2 県 3 海域から採取されたものであった。

### 2. 糞便材料からの NoV 検出

ウイルス RNA は、10～20%糞便乳剤から QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) を用いて抽出した。cDNA は Random

hexamer (Amersham) および逆転写酵素 AMV XL (TaKaRa)を用いて合成した。NoV 遺伝子の検出は、Kageyama ら (JCM 41, 1548-57, 2003) のリアルタイム RT-PCR 法に従って行った。

### 3. カキからの NoV および HAV 検出

生カキは 1 ロットにつき、カキ 3 個をまとめて検査した。カキの前処理には、野田ら (広島市衛生研究所年報 25, 35-43, 2006) のアミラーゼ処理・PEG 法を用いた。即ち、むき身カキから中腸腺を摘出し、フィルター付滅菌バッグ (GSI クレオス) に入れて破碎した後、9 倍量の PBS(-) および 25mg/ml の  $\alpha$ -アミラーゼ (Wako)/PBS 溶液を加え、37°C で 60 分間攪拌した。アミラーゼ処理後、フィルターろ液 12ml を 10,000rpm 20 分間遠心した。遠心上清 10ml に PEG 6000 および NaCl を加え (最終濃度 12% PEG および 1M NaCl)、4°C で 2 時間放置した。さらに 4°C 10,000rpm 30 分間遠心した沈渣に 0.3ml の 0.5% Zwittergent 加 PBS(-)を加え、RNA 抽出用試料とした。

ウイルス RNA は、High Pure Viral RNA kit (Roche) を用いて抽出した。DNase 処理は、DNase I recombinant, RNase Free (Roche) を用いて、RNA 抽出時にカラム上で行った。cDNA は、High-Capacity cDNA RT Kit with RNase Inhibitor (Thermo Fisher Scientific) および Random hexamer を用いて合成した。

NoV 遺伝子の検出は糞便と同じ方法、HAV は野田らの方法 (平成 23 年度 総括・分担研究報告書「食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究」) に従って検

査した。

#### 4. NoV の遺伝子型別

NoV 陽性検体は Capsid N/S 領域遺伝子を増幅し、塩基配列を決定した。遺伝子型別は、Norovirus Genotyping Tool ver. 2.0 (<http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool/#/>)を用いて行った。

#### (倫理面への配慮)

本研究については、地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所倫理審査委員会の審査を受け、承認を得た。

### C. 研究結果

#### 1. 調理従事者由来 NoV の遺伝子解析

3 事例それぞれについて調理従事者および患者由来株の遺伝子型および塩基配列を比較したところ、同一事例の両者はすべて一致した (表)。

#### 2. NoV 胃腸炎事例の発生状況

NoV が検出された胃腸炎事例は 36 事例 (64.3%) であり、うち PP 疑事例は 26 事例、食中毒事例は 10 事例であった。PP 疑事例の主な原因施設は保育園 (21/26、80.8%) であった。食中毒事例は 1 月および 3 月～5 月にそれぞれ 1～3 事例ずつ発生したが、6 月～10 月に発生はなく、その後 11 月と 12 月にそれぞれ 1 事例ずつの発生があった (図 B)。

胃腸炎事例から検出された NoV は 7 種類 (GI : 2 種類、GII : 5 種類) に遺伝子型別された (図)。最も多く検出されたのは 18 事例から検出された GII.2 であり、次いで GII.6 (6 事例、16.7%)、GII.17 (4

事例、11.1%)、GII.3 (3 事例、8.3%)、GII.4 (3 事例、8.3%) の順であった。GII.2 の検出は食中毒事例および PP 疑事例の両方でそれぞれ 50.0% を占めたのに対し、GII.6 は PP 疑事例からのみ検出され、GII.17 は食中毒事例から主に検出された (3/4、75.0%)。GII.4 の検出はすべて PP 疑事例からであり、食中毒事例からの検出は無かった。

#### 3. 生食用カキの NoV 汚染状況

検査したすべてのカキから NoV および HAV は検出されなかった。

### D. 考察

病原体や感染経路の特定は、食中毒の判断を行う上で非常に重要な根拠となる。また、調理従事者からの汚染が原因として疑われる場合、施設フキトリや調理従事者と患者から検出された病原体の遺伝子型等が一致することは有力な判断材料になる。今回解析した調理従事者由来 NoV の遺伝子解析において、すべての事例で患者由来株と遺伝子型、塩基配列が一致していたことは調理従事者からの二次汚染が原因であったことを強く示唆している。事例番号 1 (表) について、患者はすべて市外であったが、他衛生研究所よりご提供いただいた患者由来 NoV 塩基配列と、当研究所の検査結果より得られた調理従事者由来 NoV 塩基配列が一致した。本事例においては食中毒の判断には至らなかったが、検出された NoV の遺伝子解析が原因究明に役立った。また、異なる検査機関におけるウイルスゲノムの遺伝子解析には共通の領域を用いる必要性が

改めて示された。

しかし、患者等からの検査を実施している中で、遺伝子解析を並行して行うことには作業場所、人員、コンタミネーション、コスト等の多くの課題があるため容易ではない。事例ごとに状況を考慮して遺伝子解析実施を判断する必要があると考えられた。

2018/19 シーズンは大阪府の感染性胃腸炎の定点あたり患者報告数が第51週でピーク(9.20)になり、大阪府では過去10年において昨シーズンに次いで低い値であった。大阪市内での集団事例の発生状況も同様に例年と比較して少なく、今のところ、NoV 流行は小規模である。検出された遺伝子型の割合は2018年6月まではGII.2が多数を占めたが、7月以降は抜き出て多く検出される遺伝子型はなかった。長きに渡ってNoV 流行の主体であったGII.4は、PP 疑事例ではGII.2、GII.6に次いで多く検出されたものの、食中毒事例からは検出されなかった。しかしながら、GII.4はこれまで新しい亜型の出現に伴って大流行を繰り返してきたことから、引き続きその動向を注視すべきである。

NoV 食中毒の原因食品のひとつである生カキ中のNoV 汚染状況を監視することはNoV 感染リスクを評価する上で重要であり、ヒトにおけるNoV 流行予測にもつながる可能性がある。今回はすべての生食用カキからNoV は検出されなかった。今のところ、2018/19 シーズンは全国的に感染性胃腸炎の流行が昨シーズンと同様に低調であり、NoV の流行も同様であると考えられる。例年、この時期の市販生カ

キにNoV 汚染が認められることは多いが、今シーズンのNoV 流行状況がカキのNoV 検査結果に反映されたものと考えられた。一方で、2018年におけるA型肝炎は第52週までに全国で925例が報告された。この数字は1999年以降最大で、近年は年間約100~300例で推移していたことを考慮すると(<https://www.niid.go.jp/niid/ja/id/1558-disease-based/a/hepatitis/hepatitis-a/idsc/idwr-sokuhou/8423-hepa-181120.html>)、2018年はカキのHAV 汚染に対する懸念が大きいと考えられたが、本研究において検査に供された2県3海域のカキはすべてHAV 陰性であった。生食用カキ生産者の食中毒を防ぐ取り組みが奏功しているのかもしれない。

## E. 結論

1. 患者の所在地が他自治体のみの場合でも、調理従事者と患者由来ウイルスの遺伝子型および塩基配列解析は感染経路解明に有用な情報となった。
2. 2018/19 シーズンの大阪市におけるNoV 流行状況は、今のところ例年と比較して小規模である。また、食中毒疑事例ではGII.4が検出された事例が認められなかった。
3. 12月市販の生食用カキにNoV およびHAV 汚染は認められなかった。

## F. 研究発表

1. 論文発表  
1) 山元誠司, 江川和孝, 馬場 孝, 平井有紀, 改田 厚, 久保英幸, 阿部仁一郎,



小笠原準, 春見 真, 藤森良子, 藤原遥香, 岡田めぐみ, 桑原 靖, 村中康一: ヒトパレコウイルス 3 型が原因と考えられた感染性胃腸炎集団事例\_\_大阪市 2018 年, 病原微生物検出情報 月報 39, 203-204 (2018)

2) van Beek J, de Graaf M, Al-Hello H, Allen DJ, Ambert-Balay K, Botteldoorn N, Brytting M, Buesa J, Cabrerizo M, Chan M, Cloak F, Di Bartolo I, Guix S, Hewitt J, Iritani N, Jin M, Johne R, Lederer I, Mans J, Martella V, Maunula L, McAllister G, Niendorf S, Niesters HG, Podkolzin AT, Poljsak-Prijatelj M, Rasmussen LD, Reuter G, Tuite G, Kroneman A, Vennema H, Koopmans MPG: Analysis of norovirus molecular surveillance data collected through the NoroNet network, 2005 - 2016, The Lancet Infectious Diseases 18, 545-553 (2018)

2. 学会発表: なし

3. 業界関係者向け説明会

1) 「ノロウイルス胃腸炎と感染予防対策」平成 30 年度ノロウイルス講演会、2018 年 11 月 14 日 (水)、サンクスエア堺サンクスエアホール、合計約 190 名、公益社団法人大阪食品衛生協会、講師 (入谷展弘)

2) 「ノロウイルス胃腸炎と感染予防対策」平成 30 年度ノロウイルス講演会、2018 年 11 月 22 日 (木)、大阪ガス (株) ハグミュージアムハグホール、合計約 170 名、公益社団法人大阪食品衛生協会、講師 (入谷展弘)

#### 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

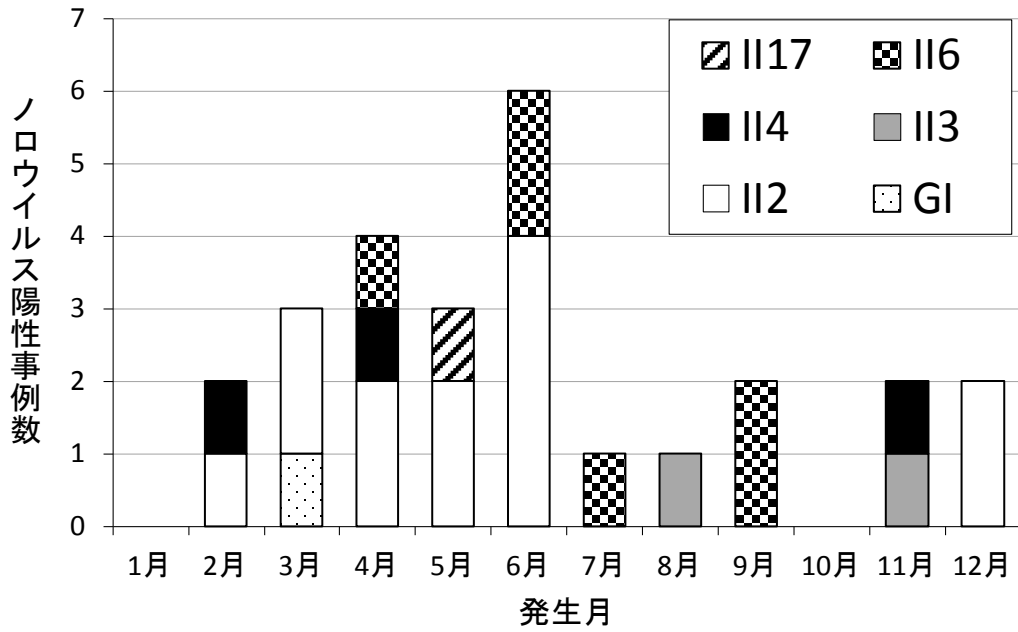
表 調理従事者および患者から検出された NoV 遺伝子の比較

事件 番号	発生 場所	推定 原因	患者			調理従事者			
			検査 数	陽性 数	遺伝子 型	検査 数	陽性 数	患者由来 NoV との比較*	
								遺伝子型	塩基配列
1	飲食店	食品	不明**	3**	GII.17	4	1	○	○
2	飲食店	食品	9	6	GI.3	16	3	○	○
3	飲食店	食品	13	11	GII.2	4	3	○	○

\* ○ : 患者由来株と同一

\*\* 他自治体の検査結果を含む

**A**



**B**

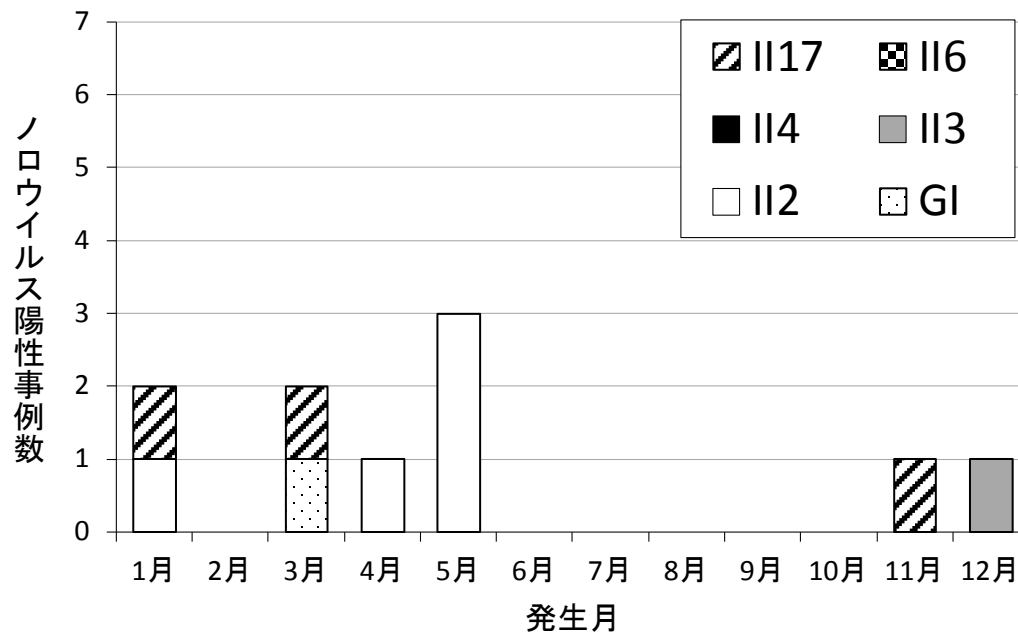


図 大阪市におけるNoV事例発生状況（2018年）  
 A, ヒトからヒトへの感染疑事例  
 B, 食中毒事例（疑いを含む）

平成 30 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

下水サンプルを用いた腸管感染ウイルスの流行解析

研究協力者	三好 龍也	堺市衛生研究所
研究協力者	中谷 誠宏	堺市衛生研究所
研究協力者	岡山 文香	堺市衛生研究所
研究協力者	福井 陽子	堺市衛生研究所
研究協力者	内野 清子	堺市衛生研究所
研究協力者	山本 憲	堺市衛生研究所
研究分担者	上間 匡	国立医薬品食品衛生研究所

**研究要旨**

食中毒対策の一助とするために、食中毒の原因として重要なノロウイルス (NoV) 及び患者発生の頻度は低い食中毒の起因ウイルスとなり得る NoV 以外の腸管感染ウイルスについて、下水サンプルを用いてウイルスの遺伝子検出を行い、臨床サンプルからの結果と合わせて分子疫学的解析を行った。

NoV については、臨床サンプルと下水サンプルから検出される遺伝子型に相関がみられ、下水から高頻度に検出される遺伝子型が臨床サンプルから検出された。一方、2017/18 シーズンは NoV による感染性胃腸炎患者や食中毒の発生の報告は少数であったが、下水中の NoV 遺伝子量は高値であった。原因は不明であるが、不顕性感染が多かった等が考えられる。サポウイルス等の臨床サンプルから検出の少ない下痢症ウイルスについても下水サンプルからは高頻度に検出され、不顕性感染等の存在が示唆された。

2018 年 12 月に A 型肝炎ウイルスが下水サンプルから検出された。遺伝子解析の結果から同年 5 月の急性肝炎症例の HAV と近縁のウイルスであった。この系統のウイルスの地域的な流行があった可能性が考えられた。

下水サンプルを用いた流行解析は、流入地域におけるウイルス感染の包括的把握が可能と考えられる。これらウイルス感染症の感染実態を解明する上で有用な情報を提供すると考える。

**A. 研究目的**

食中毒対策の一助とするために、食中毒の原因として重要なノロウイルス

(NoV) について、食中毒や感染性胃腸炎の散発・集団発生から得られた患者便等の臨床面と下水処理場の流入水の環境面

の両面から流行状況を調査し、NoV 流行の全体像を把握、解析することを目的とする。

また、患者発生の頻度は低いですが食中毒の起因ウイルスとなり得る NoV 以外のウイルスの検出も実施し、流行状況の解析も行った。

## B. 研究方法

### 1. 材料

環境サンプルとして、2016年1月から2018年12月までに堺市内の3つの下水処理場で毎月1回採水された流入水(2リットル) 108検体を調査対象とした。臨床サンプルとして、同期間に発生した食中毒及び集団感染事例9事例、散発事例(感染症発生動向調査における感染性胃腸炎患者等) 56例を調査対象とした。

### 2 下水サンプルの濃縮法

これまでの報告書に準じて行った。すなわち、流入水を遠心後(3,400xg 30min)のち、13,000xg 45min)、上清1,000mlを分取し、最終濃度0.05MとなるようにMgCl<sub>2</sub>を添加後、HClでpH3.5に調整した。調整済み液をHAフィルター(0.45μm)でろ過し、ウイルスをフィルターに吸着させた。フィルターを細断し、pH10.5グリシンbuffer(流入水:5.0ml)で溶出後、HClでpH6.5に再調整し、11,000xg 20min遠心した上清140μLを用いて、RNA抽出を行った(QIAamp Viral RNA Mini Kit: QIAGEN)。

### 3 ウイルス遺伝子検出法

臨床サンプルについては、RNA抽出後、

NoV、サポウイルス(SaV)、アストロウイルス(AsV)、アイチウイルス(AiV)については、ウイルス性下痢症診断マニュアルに準じてそれぞれウイルス遺伝子検出を行い、A型肝炎ウイルス(HAV)については、nested RT-PCR(primers: JCT-2F/1R-A/2R)により遺伝子検出を行った。陽性例については、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定し、系統樹解析により遺伝子型を判定した。

下水サンプル(流入水)については、濃縮処理後、臨床サンプルと同様にウイルス遺伝子検出を行った。下痢症ウイルスについては、TAクローニングを行い、塩基配列を決定した。遺伝子型は系統樹解析により判定した。NoVの遺伝子型番号は、Norovirus Genotyping Tool Version 2.0(<https://www.rivm.nl/mpf/typingtool/norovirus/>)に従った。また、流入水を用いてNoVリアルタイムPCRを実施し、採取水1ml当たりのコピー数を算出した。

(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. NoV 遺伝子検出結果

2018年は、臨床サンプルからGIで2種類(GI. 2, 3)、GIIで6種類(GII. 2, 3, 4, 6, 13, 17)計8遺伝子型のNoVが検出された。GII. 4型が散発例から高頻度に検出された(図1)。

下水サンプルでは、GIで5種類(GI. 1, 2, 3, 4, 7)、GIIで8種類(GII. 2, 3, 4, 6, 8, 13, 17, 21)計13遺伝子型が検出

された。GI. 2, GII. 2, GII. 4, GII. 6, GII. 17 型が多く検出された (表 1)。

## 2. 下水中の NoV 遺伝子定量測定結果

2018 年の下水中の NoV GII 遺伝子量は、1~6 月まで 100~1000 コピー/mL 程度が続き、7~9 月に減少し、10 月から増加した。ほとんどの調査点で、GII の遺伝子量は、GI より 10~100 倍程度多かった。(図 2)。感染症発生動向調査による感染性胃腸炎患者の報告数 (11 月~2 月) は少数であった。しかし、同時期の下水中の NoV GII 遺伝子量は多くなる傾向がみられた (図 3)。

## 3. NoV 以外のウイルス遺伝子検出結果

SaV については、下水サンプルでは、2018 年は年間を通じてすべての月で検出され (GI. 1, 2, 3, GII. 1, 3, 8, GV)、GI. 1, 2, GV 型が多く検出された (表 2)。GV 型については、過去 2016-2017 年の 2 年間は検出がなかったが、2018 年は臨床サンプルから 5 月に、下水サンプルから多くの月で検出された (表 2)。

AsV、AiV については、下水サンプルでは、年間調査期間を通じてすべての月で検出された。臨床サンプルからは AsV が 2018 年 7 月と 12 月に検出され、AiV は検出されなかった (表 2)。

HAV については、2018 年 5 月に急性肝炎症例から検出され、また、12 月の D 下水処理場の下水サンプルからも検出された (表 2)。遺伝子型は両方とも IA 型であった (図 4)。

## D. 考察

NoV の遺伝子型については、臨床サンプルから検出された遺伝子型のほとんどが下水中からも検出された。特に GI. 2 型 GII. 2 GII. 4 GII. 6 GII. 17 型が下水中から高頻度に検出され、それらの遺伝子型が臨床サンプルでも検出された。堺市では 2017/18 年シーズンは、NoV によると考えられる感染性胃腸炎患者の報告数が数シーズン前と比較して少数であったが、同時期の下水中の NoV 遺伝子量 (GII) は、高値であった。不顕性感染が多かった等の原因が考えられるが、原因は不明であり、詳細な遺伝子解析等が必要と考える。これらのことより、下水中の NoV 遺伝子を調査することにより、小児科定点からの感染性胃腸炎報告数や、集団・散発事例の NoV 食中毒・感染症の報告には現れない市中の流行実態を把握解明することができると考えられる。

SaV、AsV、AiV については、臨床サンプルからの検出は少数であったが、下水サンプルからは年間を通して高頻度で検出された。これらのウイルスについては、臨床症状が NoV に比べて軽症又は不顕性感染が多く受診しない例が多い、小児以外の成人での感染が多く、定点報告に現れないなどの可能性などが考えられた。

HAV については、2018 年 12 月に D 下水処理場の流入水から HAV 遺伝子が検出された。同時期には当該下水処理場の地域では患者発生の報告はなかったが、この地域に HAV 感染者が存在していたと推測された。2018 年 5 月に発生した急性肝炎症例は、冷凍アサリとの関連が疑われた症例であったが、遺伝子解析の結果、2018

年12月に下水から検出されたHAVと非常に近縁のウイルスであった。この系統のウイルスの地域的な流行があった可能性が考えられた。

A型肝炎については、潜伏期間が約1カ月と長期であるため。疫学調査において感染源の特定が一般的に困難な事例が多い。また、不顕性感染も多いため、感染実態の把握をすることも難しい。下水中のHAV遺伝子を解析することにより、流入地域における不顕性感染を含めたウイルスの浸淫状況の把握に有力な解析手法であることが考えられた。

下水中のウイルス遺伝子検出は、広域的な感染状況の把握や流行ウイルスの遺伝子型について解析する有効な手段である。また、下水中に含まれるウイルスは、カキなどの二枚貝の汚染源となる可能性があり、それらを解析することは、カキなどの汚染源の調査やカキ等を原因とする食中毒の解析にも寄与すると考えられる。

## E. 結論

下水サンプルを用いて腸管感染ウイルスの検出を行った。NoV以外にもSaV、AsV、AiV、HAVが検出された。これらの結果より流入地域におけるウイルスの流行状況の包括的把握が可能であった。また、下水の調査はこれらウイルス感染症の感染実態を解明する上で有用な情報を提供すると考える。

## 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

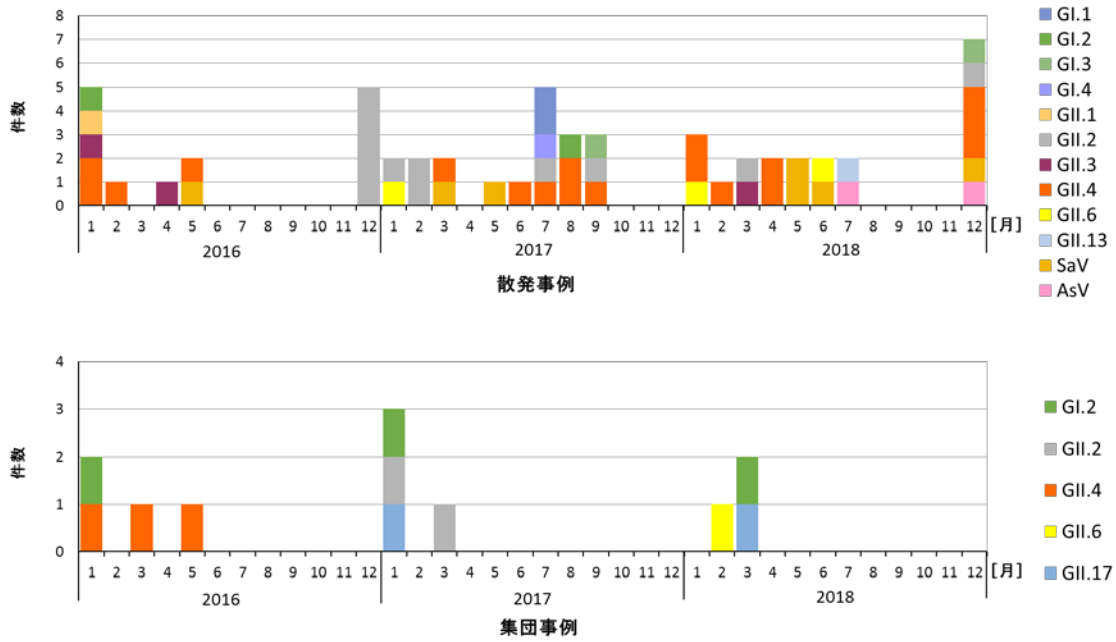


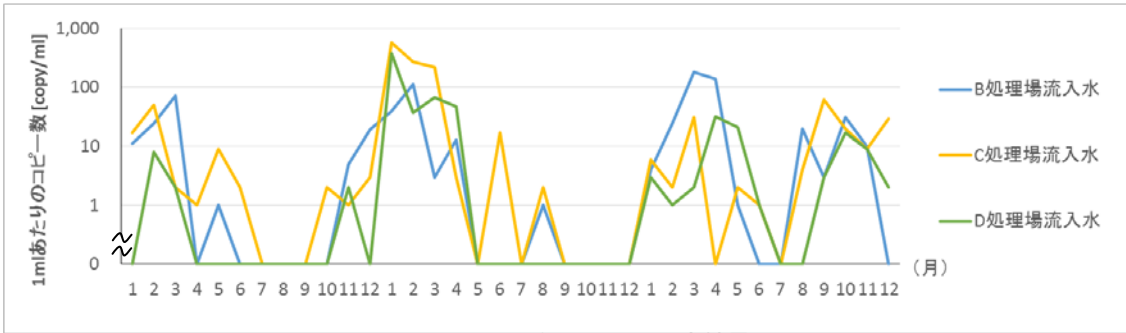
図 1 臨床検体からの下痢症ウイルス検出状況

表 1 下水中の NoV 検出状況(B~D 定点流入水)

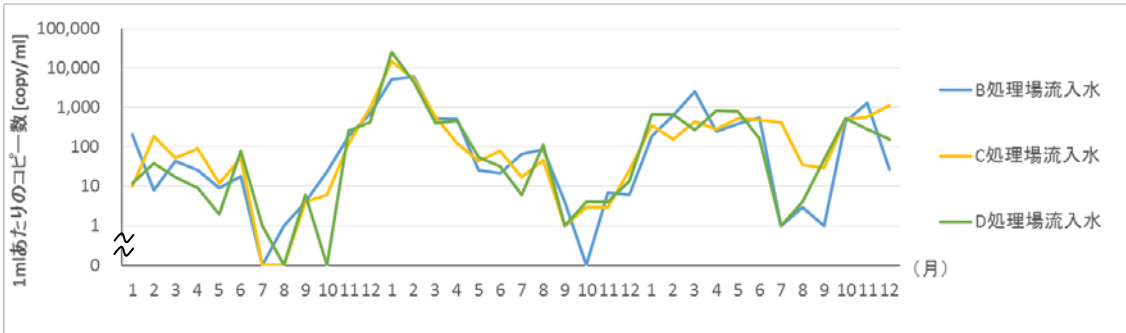
検出 virus	2016年												2017年												2018年														
	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月			
NoV	GI.1 B C D													■																									
		GI.2 B C D	■												■												■												
			GI.3 B C D	■												■												■											
				GI.4 B C D	■												■												■										
	GI.6 B C D				■												■																						
		GI.7 B C D			■												■												■										
			GII.2 B C D		■												■												■										
				GII.3 B C D	■												■												■										
	GII.4 B C D				■												■												■										
		GII.6 B C D			■												■												■										
			GII.8 B C D		■												■												■										
				GII.13 B C D	■												■												■										
	GII.17 B C D				■												■												■										
		GII.21 B C D			■												■												■										

■ 型別実施中





NoV GI リアルタイム PCR 測定結果



NoV GII リアルタイム PCR 測定結果

図2 下水中のNoV遺伝子定量結果



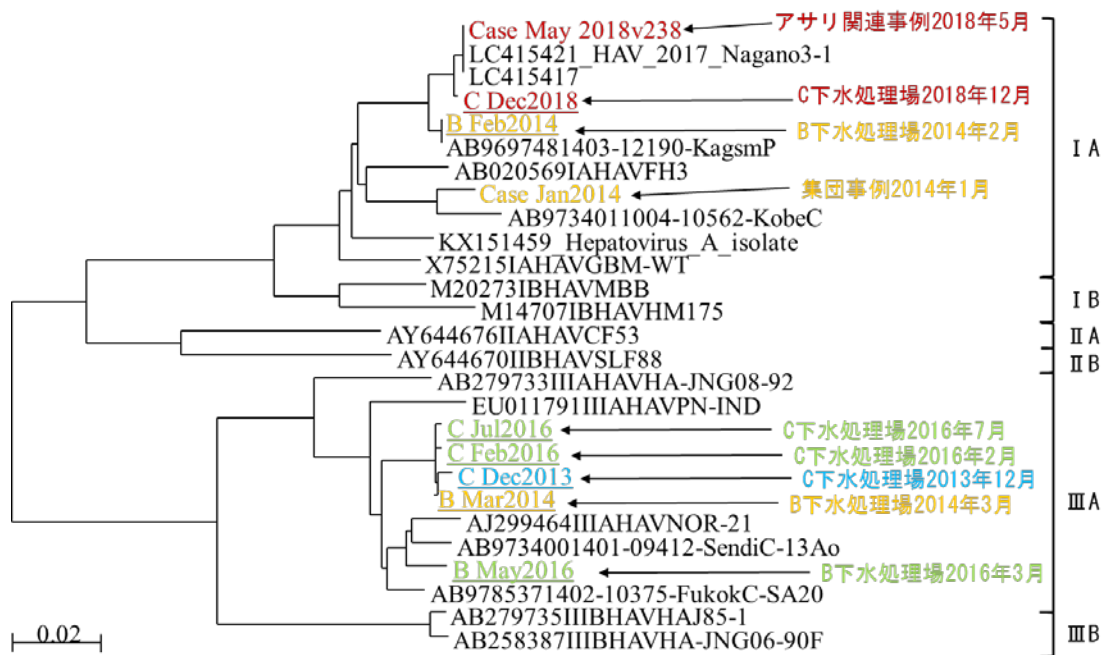


図 4 HAV 遺伝子系統樹解析結果(NJ 法)

平成 30 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

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
研究分担者	上間 匡	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改良法について、Nested-リアルタイム PCR 法での判定基準の策定とウイルス核酸抽出時に使用するキットの検討を行った。その結果、Nested-リアルタイム PCR 法での判定は、2<sup>nd</sup> PCR のリアルタイム PCR 反応サイクルを 30 サイクルとし、Cp 値 25 以下で検出された検体を陽性とする事とした。また、核酸抽出キットに NucleoSpin Virus を用いることにより、遺伝子検査時の PCR 反応に持ち込めるウイルスゲノム量の改善が図られた。一連のふき取り操作から Nested-リアルタイム PCR 法での検出限界は、100cm<sup>2</sup> あたり 10<sup>3</sup> ゲノムコピーオーダー程度であると推察された。

### 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のウイルス量は少量であることから、効率的な検出法が必要とされている。平成 28-29 年度の成果として、①極少量のふき取り液に界面活性剤を添加することで、ふき取りによるウイルス回収率の向上とふき取り後の濃縮操作を省略できること、②ふき取り液に添加する界面活性剤には食品添加物指定の界面活性剤も利用可能であることを報告した。一方、

ふき取り検体中のウイルス量は極微量であることから更なる検出率の向上を図る必要があるが、そのためにはふき取り検体から効率良くウイルス核酸を抽出し、PCR 反応へ持ち込むことが必要である。また、検出されるウイルス量が数コピーである場合は、リアルタイム PCR 法単独での判定には限界がある。そこで、判定に Nested-リアルタイム PCR 法を用いることを前提とした判定基準の策定と、ふき取り液からウイルス核酸を抽出する際の核酸抽出キットの検討を行うとともに、ふき取り検体からの Nested-PCR 法によるノロウイルス検出限界を明らかにする。

## B. 研究方法

### 1. Nested-リアルタイム PCR 法によるウイルス判定基準の策定

ノロウイルス GII のスタンダードプラスミド (2, 5, 10 コピー/反応) をテンプレートに 1<sup>st</sup> PCR (conventional PCR: COG2F, ALPF/G2SKR, G2ALSKR) を 40 サイクル実施し、その後 1<sup>st</sup> PCR 産物 2.5  $\mu$ l をテンプレートに 2<sup>nd</sup> PCR (リアルタイム PCR: COG2F/COG2R RING2AL-TP) を 40 サイクル実施した (表 1)。各 5 回の試験を行い、2<sup>nd</sup> PCR 反応におけるウイルス検出 Cp 値と陽性率を比較した。

### 2. ウイルス核酸抽出キットの性能比較

供試材料には、界面活性剤添加無し、または有りの PBS(-) で希釈したノロウイルス陽性便乳剤 (10<sup>5</sup> コピー程度/700-800  $\mu$ l) を用いた。核酸抽出キットには現行の QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) と、より多くのサンプル量を供試できる NucleoSpin Virus、および NucleoSpin RNA Blood (いずれも MACHEREY-NAGEL) を比較検討した (表 2)。同一サンプルからそれぞれ 3 回の核酸抽出試験を行い、逆転写反応後に表 1 にあるリアルタイム PCR 用のプライマー、プローブ系を用い定量を行った。得られた定量値から、希釈便乳剤全量におけるウイルス量を推定し、キットの性能を比較した。

### 3. ふき取り検体からのウイルス検出比較試験

供試材料には、ノロウイルス (遺伝子型 GII. 17) 陽性の PBS(-) 希釈便乳剤を用

いた。検出工程は図 1 のとおり。

ステンレス製トレー上の 10 cm  $\times$  10 cm の区画に希釈した便乳剤 140  $\mu$ l を滴下し、コーンラージ棒で塗布後、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(-) または、2.5% Tween20 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 回のふき取り操作を 2 回行った。各希釈につき 5 区画のふき取り試験を実施した。

ふき取り棒に回収したウイルスを極少量の 0.3% Zwittergent 加 PBS(-)、または 2.5% Tween20 加 PBS(-) に再浮遊させ、その全量を回収した。同一ふき取り回収液から QIAamp Viral RNA Mini Kit と NucleoSpin Virus による RNA 抽出を行った後、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った。定量試験では表 1 にあるリアルタイム PCR 用のプライマー、プローブ系を用いウイルスゲノム量を定量した。定性試験では、表 1 の Nested-リアルタイム PCR 法により、Cp 値 25 以下を陽性と判断した。

(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-リアルタイム PCR 法によるウイルス検出

1<sup>st</sup> PCR 反応液へ加えたウイルス量毎に Nested-リアルタイム PCR での検出状況、並びに検出 Cp 値を表 3 に示した。5 回の試験のうち 10 コピーでは、すべてで陽性

となり、5 コピーでは3回、2 コピーでは3回で陽性となった。検出 Cp 値は17.2~30.2であったが、5 コピーの30.2を除くと概ね21以下で検出された。

## 2. 核酸抽出キットの性能比較

PBS(-)で希釈したノロウイルス陽性便乳剤から各核酸抽出キットを用いてウイルス RNA を抽出した際の抽出効率を比較した(表4)。希釈便乳剤全量に換算した際のウイルスコピー数の対比では、NucleoSpin Virus は QIAamp Viral RNA Mini Kit に対し1.3倍と同等に近い値であった。一方、NucleoSpin RNA Blood は QIAamp Viral RNA Mini Kit に対し0.6倍で、劣る結果となった。次に、界面活性剤加 PBS(-)で希釈したノロウイルス陽性便乳剤における QIAamp Viral RNA Mini Kit と NucleoSpin Virus での抽出効率を比較した結果を表5に示した。希釈便乳剤全量に換算した際のウイルスコピー数の対比では、0.3% Zwittergent 加 PBS(-)で NucleoSpin Virus は QIAamp Viral RNA Mini Kit に対し1.1倍とほぼ同等に対し、2.5% Tween20 加 PBS(-)では0.7倍となり劣った。

## 3. ふき取り検体からのウイルス検出比較試験

ステンレス製トレーにノロウイルス便乳剤を塗布した模擬検体からのノロウイルスのふき取り回収において、核酸抽出キットの比較を行った結果を表6と表7に示した。定量試験におけるリアルタイム PCR での実測値(表6)は、ふき取り液中の界面活性剤が0.3% Zwittergent の場

合、QIAamp Viral RNA Mini Kit の実測値に対し、NucleoSpin Virus の値は約2倍であった。ただし、塗布したウイルス量に対するふき取り回収液の平均回収率は、QIAamp Viral RNA Kit の41.1%に対し NucleoSpin Virus は33.4%と劣った。ふき取り液中の界面活性剤が2.5% Tween20 の場合、QIAamp Viral RNA Mini Kit の実測値に対し、NucleoSpin Virus の値はやや良い程度であり、塗布したウイルス量に対するふき取り回収液の平均回収率は、QIAamp Viral RNA Mini Kit の32.6%に対し NucleoSpin Virus は18.1%と大きく劣った。

次に Nested-リアルタイム PCR 法による定性試験での判定結果(表7)は、100cm<sup>2</sup>あたり 10<sup>3</sup> オーダーのウイルス量を塗布した場合、ふき取り液中の界面活性剤の種類に関わらず、QIAamp Viral RNA Mini Kit ではほぼすべてで、NucleoSpin Virus ではすべてでウイルスが検出された。一方、100cm<sup>2</sup>あたり 10<sup>2</sup> オーダーのウイルス量を塗布した場合、ウイルス量が少なくなるほど、検出率は低下し、NucleoSpin Virus の方が、QIAamp Viral RNA Mini Kit に比べ、わずかに検出率が高かった。

## D. 考察

ふき取り検体からのウイルス検出感度の向上とウイルス量が低コピーの場合の判定を明確にするために、検査に用いる核酸抽出キットの検討と Nested-リアルタイム PCR 法での判定基準の策定を行った。

ノロウイルス GII のスタンダードプラスミド(2, 5, 10 コピー/反応)をテンプレ

ートに Nested-リアルタイム PCR を実施した結果、2<sup>nd</sup> PCR での Cp 値は概ね 21 以下であったことから、2<sup>nd</sup> PCR のサイクル数を 30 とし Cp 値 25 以下を陽性とすることにした。また、1<sup>st</sup> PCR のテンプレート中のウイルス量が 10 コピーあれば検出可能であるが、それ以下になると一部不検出となることから、確実に検出するためには 1<sup>st</sup> PCR 反応に 10 コピー以上のウイルス量が必要と考えられた。このことは、更なるウイルス検出効率の向上には、ふき取り検体から核酸抽出を行うにあたり、できるだけ多い容量の検体を供試でき、かつ少量の溶出液で核酸を溶出できるキットが必要とされることを示唆している。現行使用している QIAamp Viral RNA Mini Kit では、供試できる検体容量が正規の使用では 140  $\mu$ l のところを、2 倍の 280  $\mu$ l で供試し、計 4 回カラムに通すことで対応している。また、溶出液量も正規の 60  $\mu$ l のところを 50  $\mu$ l での溶出で行っている。そこで、QIAamp Viral RNA Mini Kit よりも多い容量の検体を処理でき、かつより少量の溶出液で核酸溶出が可能なキットとして NucleoSpin Virus と NucleoSpin RNA Blood の 2 つのキットの適用性について検討した。ノロウイルス陽性の便乳剤を用いた性能比較では、NucleoSpin Virus が QIAamp Viral RNA Mini Kit と同等の抽出効率を示すことが分かった (表 4, 5)。そこで、この 2 つのキットについてふき取り検体からのウイルス検出比較試験を行った。0.3% Zwittergent 加 PBS(-)でのふき取り回収試験では、QIAamp Viral RNA Mini Kit に比べ NucleoSpin Virus では cDNA 中の

ウイルスゲノムコピー数が約 2 倍の結果を示し (表 6)、良好であった。一方 2.5% Tween20 加 PBS(-)でのふき取り回収試験では、QIAamp Viral RNA Mini Kit に比べ NucleoSpin Virus では、cDNA 中のウイルスゲノムコピー数はやや多い程度であった (表 6)。便乳剤を用いた性能試験においても、Tween20 を便乳剤に加えると NucleoSpin Virus での回収率が低下することがわかっており (表 5)、Tween20 加 PBS(-)でのふき取り回収試験における NucleoSpin の結果がそれほど良くないのは、この結果を反映していると思われた。Nested-リアルタイム PCR 法による検出結果では、QIAamp Viral RNA Mini Kit、NucleoSpin Virus とともに 100cm<sup>2</sup>あたり 10<sup>3</sup> コピーオーダーのウイルス量があればほぼ検出可能であるが、10<sup>2</sup> コピーオーダーのウイルス量では、少なくなればなるほど不検出となる割合が高くなる傾向が認められた (表 7)。ただし、NucleoSpin Virus の方が QIAamp Viral RNA Mini Kit と比べてやや良い結果であったことは、NucleoSpin で抽出した核酸の濃度が QIAamp Viral RNA Mini Kit より濃いことを反映していると考えられた。最終的に本法での検出限界は、100cm<sup>2</sup>あたり 10<sup>3</sup> コピーオーダー程度であると推察された。

## E. 結論

Nested-リアルタイム PCR 法での判定基準は、2<sup>nd</sup> PCR のサイクル数を 30 とし Cp 値 25 以下を陽性とすることにした。

ふき取り液からのウイルス核酸抽出には NucleoSpin Virus を用いることで PCR 反応に持ち込めるウイルスゲノムコピー

数が現行の 2 倍程度に増加した(ただし、ふき取り液に 2.5% Tween20 加 PBS(-)を用いる場合は、十分な効果が得られない)。

一連のふき取り操作から Nested-リアルタイム PCR 法での検出限界は、100cm<sup>2</sup>あたり 10<sup>3</sup> コピーオーダー程度であると推察された。

## 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



表1 Nested-リアルタイムPCR反応条件

	使用酵素	プライマー	プローブ	反応系	反応温度条件
1st PCR	TaKaRa EX Taq	COG2F, ALPF /G2SKR, G2ALSKR	-	50μl	94℃/3min (94℃/1min→50℃/1min→72℃/1min)×40 72℃/15min
2nd PCR	LightCycler480 Probes Master	COG2F/COG2R	RING2AL-TP	25μl	95℃/10min (95℃/15sec→56℃/60sec)×40 40℃/30sec

表2 使用核酸抽出キット

キット名	メーカー名	供試サンプル量	溶出量
QIAamp Viral RNA Mini Kit	QIAGEN	140μl×2	50μl
NucleoSpin Virus	MACHERY-NAGEL	400μl	30μl
NucleoSpin RNA Blood	MACHERY-NAGEL	400μl	40μl

ふき取り液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)



低速遠心後 (90×g), 綿球を絞り、ふき取り液(700-800μl)を回収



核酸抽出

QIAamp Viral RNA Mini Kit (サンプル量140μl×2→50μlで溶出)

NucleoSpin Virus (サンプル量400μl→30μlで溶出)

逆転写反応：(PrimeScript RT reagent Kit)

20μl反応系でRNA10μlを供試



定量試験：リアルタイムPCR法による回収ウイルス量の定量

定性試験：Nested-リアルタイムPCR法による判定

図1 ふき取り検体からのウイルス検出試験

表3 ウイルスコピー数とNested-リアルタイムPCRにおける検出Cp値

1 <sup>st</sup> PCR反応液 中のコピー数	反復数5回におけるCp値					平均 Cp値	陽性率	
	1	2	3	4	5		Cp値25まで	Cp値30まで
2コピー	20.8	18.6	不検出	18.0	不検出	19.1	3/5	3/5
5コピー	不検出	30.2	19.3	17.6	不検出	22.4	2/5	2/5
10コピー	20.4	17.3	18.2	19.2	17.2	18.5	5/5	5/5

表4 核酸抽出キットの性能比較

試験No.	キット名	試験数	供試 サンプル量	溶出量	ウイルス量 平均換算値 (コピー数/800μl)	QIAamp Viral RNA Mini Kit との対比
No.1	QIAamp Viral RNA Mini Kit	3	140μl×2	50μl	9.38×10 <sup>4</sup>	-
	NucleoSpin Virus	3	400μl	30μl	1.19×10 <sup>5</sup>	1.3
No.2	QIAamp Viral RNA Mini Kit	3	140μl×2	50μl	7.10×10 <sup>5</sup>	-
	NucleoSpin RNA Blood	3	400μl	40μl	4.01×10 <sup>5</sup>	0.6

表5 核酸抽出キットの性能比較 (界面活性剤の影響)

界面活性剤	キット名	試験数	供試 サンプル量	溶出量	ウイルス量 平均換算値 (コピー数/700μl)	QIAamp Viral RNA Mini Kit との対比
0.3% Zwittergent	QIAamp Viral RNA Mini Kit	3	140μl×2	50μl	6.38×10 <sup>4</sup>	-
	NucleoSpin Virus	3	400μl	30μl	7.56×10 <sup>4</sup>	1.1
2.5% Tween20	QIAamp Viral RNA Mini Kit	3	140μl×2	50μl	7.46×10 <sup>4</sup>	-
	NucleoSpin Virus	3	400μl	30μl	4.92×10 <sup>4</sup>	0.7

表6 ふき取り検体からのノロウイルス検出における核酸抽出キットの性能比較

ふき取り検体中の 界面活性剤	ウイルス塗布量 (コピー/100cm <sup>2</sup> )	サンプル No.	QIAamp Viral RNA Mini Kit		NucleoSpin Virus	
			リアルタイムPCR 実測値	ふき取り 回収率	リアルタイムPCR 実測値	ふき取り 回収率
			(コピー/2.5μl cDNA)	(%)	(コピー/2.5μl cDNA)	(%)
0.3% Zwittergent	5,320	1	23.9	44.9	38.5	30.4
		2	25.5	47.9	55.2	43.6
		3	23.1	43.4	36.0	28.4
		4	26.9	50.6	59.2	46.7
		5	9.8	21.8	22.7	17.9
		平均	21.8	41.7	42.3	33.4
2.5% Tween20	4,120	1	12.1	32.7	18.8	21.4
		2	17.8	45.1	14.8	15.7
		3	12.1	32.3	15.3	17.2
		4	6.8	18.0	16.9	18.7
		5	12.6	35.0	15.2	17.7
		平均	12.3	32.6	16.2	18.1

表7 ふき取り検体からのノロウイルス検出限界

ふき取り検体中の 界面活性剤	ウイルス塗布量 (コピー/100cm <sup>2</sup> )	試験 回数	陽性率	
			QIAamp Viral RNA Mini Kit	NucleoSpin Virus
0.3% Zwittergent	5,320	5	5/5	5/5
	2,950	5	4/5	5/5
	600	5	2/5	3/5
	110	5	0/5	2/5
2.5% Tween20	4,120	5	5/5	5/5
	230	5	2/5	3/5

平成 30 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)  
「ウイルスによる食品媒介性疾患の制御に関する研究」  
研究協力報告

## ノロウイルス G II の ORF2 全長遺伝子解析手法に関する検討

研究協力者	藤井 慶樹	広島市衛生研究所
研究分担者	上間 匡	国立医薬品食品衛生研究所
研究協力者	福永 愛	広島市衛生研究所
研究協力者	則常 浩太	広島市衛生研究所
研究協力者	兼重 泰弘	広島市衛生研究所
研究協力者	坂本 綾	広島市衛生研究所

### 研究要旨

ノロウイルス(NoV)の遺伝子解析はN/S領域(約300塩基)の配列を用いた解析法が主流である。しかし、本領域は塩基配列の多様性に乏しく、食中毒等の発生時に詳細な分子疫学的解析を行うには不向きである。そこで、N/S領域解析よりも配列情報量の多い解析を行うため、可変領域であるP2ドメインを含むORF2全長(約1680塩基)の塩基配列解析手法について検討を行った。

本研究では、22種類の遺伝子型が存在するNoV G IIの中で、検出数の多いG II. 2、G II. 3、G II. 4、G II. 6、G II. 14、G II. 17のORF2全長遺伝子を網羅的に増幅するPCR系を構築することを目標とした。

検体からのRNA抽出工程を改良し、抽出したRNAの濃縮工程を加えるとともに、最適な逆転写反応系の検討を行った。また、PCRにおいては、ORF2全長遺伝子を増幅するために、既知のプライマーに加えて、ORF2の終止コドン付近にユニバーサルプライマーを新しく設計した。

一連の検討により、上記6遺伝子型のORF2全長遺伝子を網羅的に増幅可能なPCR系を確立した。さらに、各遺伝子型のシーケンス解析に必要なプライマーについても新たに設計した。

本手法はNoV G IIによる食中毒等の発生時に、詳細な分子疫学的解析を行う必要がある場合、有効に活用できると考えられる。

### A. 研究目的

NoVの遺伝子解析は構造蛋白質VP1をコードするORF2の5'末端(N/S領域)約300塩基の配列を用いた解析法が主流である。

しかし、N/S領域は塩基配列の多様性に乏しく、本領域の塩基配列の一致は必ずしも疫学的関連性を反映しない。

食中毒事例等において、詳細な分子疫学

的解析を行うためには、NoV の遺伝子全長約 7,500 塩基の配列を解析することが最も有用と考えられるが、その作業は容易ではなく、実務的にはほぼ不可能である。そこで、N/S 領域解析よりも配列情報量の多い解析を行うために、可変領域である P2 ドメインを含む ORF2 全長遺伝子(約 1680 塩基)の解析手法について検討を行った。

## B. 研究方法

### 1. NoV GII の遺伝子型選定

NoV GII には 22 種類の遺伝子型が存在するが、検出が稀な遺伝子型も多い。そこで、IASR の胃腸炎ウイルス検出状況(2008/09~2017/18 シーズン)をもとに、検出数の多い 6 遺伝子型(GII.2、GII.3、GII.4、GII.6、GII.14、GII.17)を解析対象として選定した。詳細は表 1 に示した。

### 2. 検体からの RNA 抽出と抽出 RNA の濃縮

N/S 領域の解析による遺伝子型別分類で上記 6 遺伝子型の NoV GII が検出された糞便検体の 10% 乳剤を材料とし、遠心上清 140  $\mu$ l から QIAamp Viral RNA Mini Kit(QIAGEN)を用いて、RNA を抽出した。

RNA 抽出の際のキャリア RNA については、キット付属品を使用した場合(以下、方法 I)およびキット付属品を使用せず、代替に Yeast tRNA(Ambion)を使用した場合(以下、方法 II)の比較を行った。Buffer AVL へのキャリア RNA 添加量は、キット付属品を使用する場合はキットのマニュアルどおりに、Yeast tRNA を使用する場合は Buffer AVL に対して 0.1  $\mu$ g/ $\mu$ l 濃度となるように添加した。いずれの方法においても、抽出した 60  $\mu$ l の RNA は NucleoSpin RNA Clean-up

XS(TaKaRa)を用いて、5  $\mu$ l に濃縮した。

### 3. 逆転写反応

逆転写(RT)反応は当所で汎用的に実施している方法(以下、方法 A)および逆転写酵素と RT 用プライマーを変更した方法(以下、方法 B)により行い、両者の比較を行った。

方法 A では、High-capacity cDNA Reverse Transcription Kit(ABI)と Oligo(dT)<sub>12-18</sub> Primer(Invitrogen)を用いた。

方法 B では、SuperScript III Reverse Transcriptase(Invitrogen)および TX30SXN Primer(5' -GACTAGTCTAGATCGCGAGCGGCCGCCT<sub>30</sub>-3' )を用いた。

反応液の調整および逆転写反応の条件は表 2、3 のとおりである。

### 4. PCR

PCR の正確性と迅速性を重視し、 $\alpha$  型の DNA ポリメラーゼである PrimeSTAR GXL DNA Polymerase(TaKaRa)を用いた semi-nested PCR を行った。反応液の調整は表 4 のとおりである。1st および 2nd PCR に使用したプライマーは表 5 に示した。フォワードプライマーは既知のプライマーを使用した。リバースプライマーは ORF2 の終止コドン付近の塩基配列アライメント結果をもとに、6 遺伝子型いずれにも対応できるものを新しく設計した。

1st PCR は cDNA 5  $\mu$ l を用いて、2nd PCR は 1st PCR 産物 2  $\mu$ l を用いて、98°C10 秒、55°C15 秒、68°C2 分を 30 回、10°C で保存の反応条件で実施した。

### 5. 塩基配列解析

電気泳動により目的とする増幅サイズのバンドを確認した。事前の実験において、

PCR 産物をゲル精製した場合、塩基配列の解析がうまくいかなかった。そこで PCR 産物を ExoSAP-IT Express(Thermo Fisher Scientific)により精製し、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit(ABI)を用いて、サイクルシーケンスを行った。シーケンス解析に用いたプライマーは表 6 のとおりである。

(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. ORF2 全長の PCR 増幅

##### 1) 方法 I と方法 A の組合せにより合成した cDNA を使用した場合

電気泳動の結果、バンドが検出されない、あるいは、非特異バンドやサイズの異なるバンドが検出され、目的とする PCR 産物は得られなかった(図 1a、b)。

##### 2) 方法 II と方法 B の組合せにより合成した cDNA を使用した場合

電気泳動の結果、6 遺伝子型いずれにおいても約 1680bp 付近に目的とするバンドが明瞭に認められた(図 2)。

感度としては、糞便 1g あたりのコピー数が  $10^2$  オーダーの場合は PCR 増幅不可であった(G II. 4 での結果)が、 $10^4$  オーダーあれば PCR 増幅可能(G II. 6 での結果)であった。

#### 2. 塩基配列解析

各遺伝子型につき、それぞれ 6 種類のシーケンス解析用プライマーを用いたサイクルシーケンスを行った。

ダイレクトシーケンスの結果、ORF2 全長約 1680 塩基の配列を解析することができた。

### D. 考察

NoV G II による食中毒等の発生時に詳細な分子疫学的解析を行うため、遺伝子型別分類法の主流である N/S 領域解析よりも塩基配列情報が多く得られる ORF2 全長遺伝子の解析手法について検討を行った。

NoV G II には 22 種類の遺伝子型が存在するが、ORF2 の配列は多様性に富み、すべての遺伝子型に対応できる PCR 系を構築することは困難であった。そこで、検出数の多い 6 遺伝子型(G II. 2、G II. 3、G II. 4、G II. 6、G II. 14、G II. 17)を対象を絞り、ORF2 全長遺伝子を網羅的に増幅可能な PCR 系を構築することを目標とした。

理論上は、PCR に使用するプライマーを特異的かつミスマッチがないように設計すれば、反応液中に cDNA と DNA ポリメラーゼを加えることで反応が進み、目的とする PCR 産物が得られるはずである。しかしながら、実際の反応では、特異的なプライマーを設計しただけでは、目的とする PCR 産物が得られないことをしばしば経験する。すなわち、当所で汎用的に実施している RNA 抽出(方法 I)に RNA の濃縮工程を追加し、同じく当所で実施している RT 反応(方法 A)により cDNA を合成して PCR を行ったが、目的とする増幅産物は得られなかった。

このことは、RNA 抽出や RT 反応の過程においても、PCR の成否に影響を及ぼす様々な要因が存在していることを示唆している。

まず、RNA 抽出工程においては、キャリア RNA としてポリ A を使用するキットが多

い。そのため、オリゴ dT プライマーを用いて RT 反応を行うと、キャリア RNA がオリゴ dT プライマーと結合し、ウイルス RNA の収量低下をもたらす。そこで、キット添付のキャリア RNA は使用せず、代わりに Yeast tRNA を使用した RNA 抽出(方法 II)に変更した。

次に、RT 反応においては、ランダムプライマーを用いると、断片化された RNA からでも RT 反応が進むため、目的とする遺伝子領域を含まない cDNA も大量に合成され、PCR に影響を及ぼす。そこで、断片化されていないウイルス RNA 全長を効率よく逆転写するため、片山の方法を参考に、RT 用プライマーは 12~18 の T 配列からなるオリゴ dT ではなく、30 の T 配列からなる TX30SXN プライマーを用いた。

以上の工程改良により合成した cDNA を用いて PCR を行うことで、ORF2 全長遺伝子を増幅することが可能となった。検出感度に関しては、糞便 1g あたりのコピー数が  $10^4$  オーダー程度あれば、PCR による増幅が可能であった。

本法は、検出感度が約  $10^2$  オーダーである N/S 領域増幅系と比較すると、感度の面では劣っており、食品やスワブなど、極めて低コピー数の検体では対応できないが、糞便検体が対照であれば、十分応用可能である。

PCR においては、対象とした 6 遺伝子型を網羅的に増幅可能なプライマーを設計することができたが、塩基配列解析においては、網羅的な解析ができるシーケンス用プライマーを設計することはできなかった。

そのため、本法は最初に N/S 領域の遺伝子解析により、遺伝子型を決定した上で

ORF2 全長遺伝子の PCR を行い、その後、各遺伝子型個別に設計したプライマーを用いてシーケンスを実施する必要がある点に留意しなければならない。

本法において、G II.4 では 3 亜型、G II.2 では 2009/10~2017/18 シーズンまでの検出株が解析できており、今後、新たな亜型(変異株)が出現しても解析に対応できる可能性は高いと考えられる。ただし、ウイルス遺伝子の変異により、PCR やシーケンス解析が不良となる事態も想定されるため、プライマー配列については、随時見直しが必要である。

ORF2 は NoV の抗原性に関与する構造蛋白質 VP1 をコードしている。特に、P2 ドメインは NoV 粒子表面に位置し、エピトープが存在するため、塩基配列多様性に富む。したがって、本法による ORF2 全長遺伝子解析は、食中毒等の発生時に、詳細な分子疫学的解析を行う手法として有用に活用でき、汚染経路等の解明について科学的根拠を示すことが可能となると考えられる。

## E. 結論

NoV G II の中で、検出数の多い 6 遺伝子型(G II.2、G II.3、G II.4、G II.6、G II.14、G II.17)の ORF2 全長遺伝子を網羅的に増幅可能な PCR 系を構築した。また、各遺伝子型に対応するシーケンス解析用プライマーを設計した。

食中毒等の発生時に、詳細な分子疫学的解析を行うため、N/S 領域解析よりも有用な手法として利用できる。

## F. 研究発表

1. 論文発表：なし

2. 学会発表：なし

3. その他：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

表 1 選定した NoV G II の遺伝子型等の状況

遺伝子型	亜型	検出シーズン	(最小値～最大値)	解析数
G II. 2	—	2009/10～2017/18	9.26E+05～7.85E+10	19
G II. 3	—	2014/15～2015/16	4.59E+07～1.29E+09	2
G II. 4	Den Haag 2006b	2014/15	6.01E+05～1.03E+08	4
	New Orleans 2009	2011/12	1.46E+10	1
	Sydney 2012	2013/14、2015/16～2017/18	7.37E+02～2.09E+10	31
G II. 6	—	2013/14～2014/15	4.97E+04～5.76E+09	5
G II. 14	—	2012/13～2014/15	5.62E+06～5.25E+09	6
G II. 17	—	2014/15、2017/18	1.32E+07～1.35E+10	9

表 2 RT 反応液の調整(N=1)

<方法 A>		<方法 B>	
10X RT Buffer	1 $\mu$ l	5X First-Strand Buffer	4 $\mu$ l
10X RT Random Primers	1 $\mu$ l	dNTP Mix(10mM)	1 $\mu$ l
25X dNTP Mix	0.4 $\mu$ l	TX30SXN Primer(100 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ l
Oligo dT(0.5 $\mu$ g/ $\mu$ l)	0.1 $\mu$ l	RNase-Free Water	6.5 $\mu$ l
RNase-Free Water	2 $\mu$ l	0.1M DTT	1 $\mu$ l
MultiScribe Reverse Transcriptase(50U/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l	Recombinant RNase Inhibitor(40U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
template RNA	5 $\mu$ l	SuperScript III RT (200U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
Total	10 $\mu$ l	template RNA	5 $\mu$ l
		Total	20 $\mu$ l



表 3 RT 反応条件

<方法 A>		<方法 B>	
25°C	10 分	50°C	1 時間
↓		↓	
37°C	1 時間	70°C	15 分
↓		↓	
92°C	5 分	4°C	∞
↓			
4°C	∞		

表 4 PCR 反応液の調整(N=1)

5X PrimeSTAR GXL Buffer	10 $\mu$ l
dNTP Mixture (2.5mM each)	4 $\mu$ l
F-Primer (100 $\mu$ M)	0.15 $\mu$ l
R-Primer (100 $\mu$ M)	0.15 $\mu$ l
RNase-Free Water	29.7 $\mu$ l
PrimeSTAR GXL DNA Polymerase	1 $\mu$ l
cDNA	5 $\mu$ l
Total	50 $\mu$ l

表 5 PCR 用プライマー

	プライマー	極性	配列 (5' → 3' )
1st	COG2F	sense	CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG
2nd	G2SKF	sense	CNTGGGAGGGCGATCGCAA
1st、2nd 共通	panG II_VP1R	anti-sense	GCWANRAAAGCYCCWGCCATT

表 6 シーケンス解析用プライマー

	プライマー	極性	配列(5' →3' )
各型共通	G2-SKF	sense	CNTGGGAGGGCGATCGCAA
	G2-SKR	anti-sense	CCRCCNGCATRHCCRTTRTACAT
	panG II_VP1R	anti-sense	GCWANRAAAGCYCCWGCCATT
G II. 2	G II. 2_inner-F	sense	AAATYACYATGTTYCCYCAT
	G II. 2_inner-shF	sense	AATTCACCCCAGTYGGWCTYA
	G II. 2_inner-R	anti-sense	ARACYCTTCCCTGRAAGTCAGG
G II. 3	G II. 3_inner-F	sense	TCYGAAATGTCYAATTCYAG
	G II. 3_inner-shF	sense	ACAARRTTCACCCCAGTTGG
	G II. 3_inner-R	anti-sense	TYCCRTTYAGRTTATCCAATTG
G II. 4	G II. 4_inner-F	sense	CCACCYACAGTTGARTC
	G II. 4_inner-shF	sense	CACYCCAGTYGGYGTYRYC
	G II. 4_inner-R	anti-sense	GRATCYTYCCYACRAARTCTGG
G II. 6	G II. 6_inner-F	sense	ACCAACYGTKGARTCAAARAC
	G II. 6_inner-shF	sense	AACATGAAYYTDGCCCHGC
	G II. 6_inner-R	anti-sense	CAYCTRCCATTTTGKGGTTG
G II. 14	G II. 14_inner-F	sense	CAGTTCACCTTTCTGGTCCC
	G II. 14_inner-shF	sense	TCACACCYATTGGTGCAATG
	G II. 14_inner-R	anti-sense	CTTGCAACGCCATAYAACATG
G II. 17	G II. 17_inner-F	sense	TWGARTCTAARACWAARCC
	G II. 17_inner-shF	sense	AAATTCACACCAGTKGGMRTC
	G II. 17_inner-R	anti-sense	CRAASASKASRCCYKTGAAGT

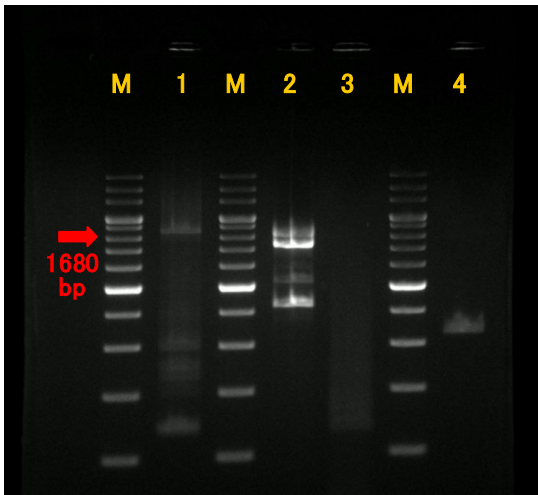


図 1a 電気泳動像(方法 I と方法 A により合成した cDNA を使用)  
M:200bp ladder  
1:GⅡ.3、2・3:GⅡ.6、4:GⅡ.14

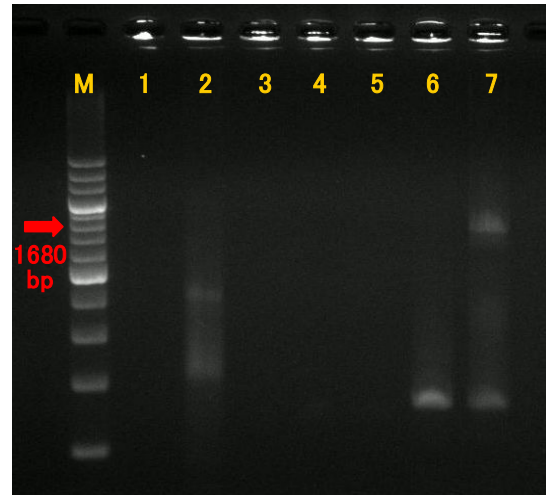


図 1b 電気泳動像(方法 I と方法 A により合成した cDNA を使用)  
M:200bp ladder  
1:GⅡ.4 Den Haag 2006b  
2:GⅡ.4 New Orleans 2009  
3:GⅡ.4 Sydney 2012  
4・5:GⅡ.2、6・7:GⅡ.17

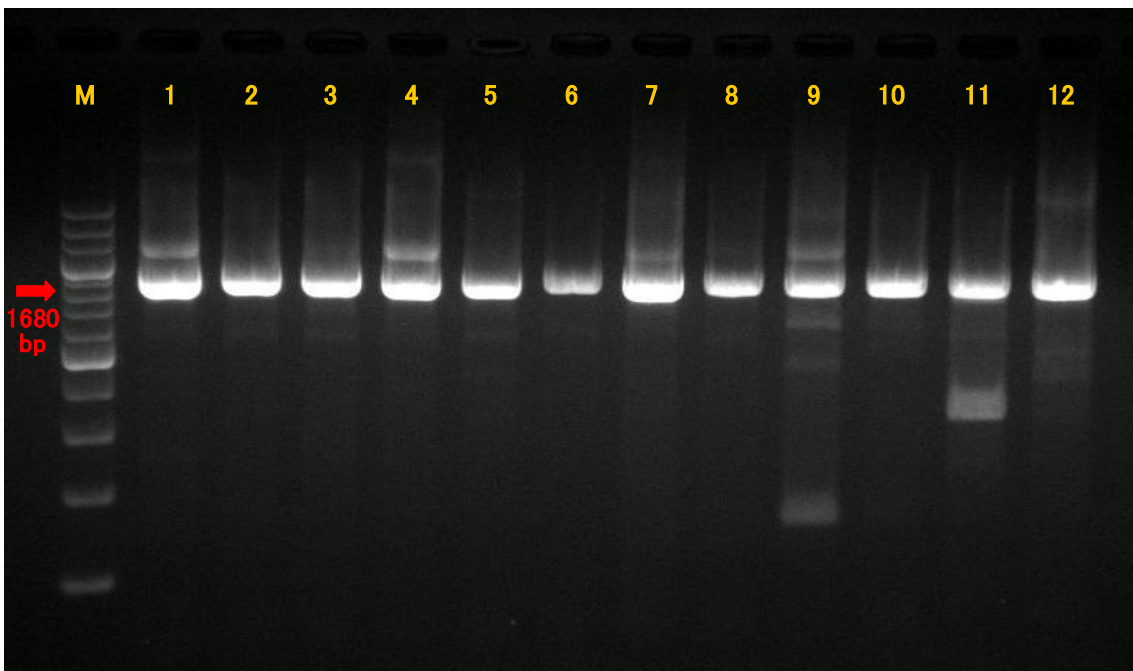


図 2 電気泳動像(方法Ⅱと方法 B により合成した cDNA を使用)  
M:200bp ladder、1:GⅡ.3、2・3:GⅡ.6、4・5:GⅡ.14  
6:GⅡ.4 Den Haag 2006b、7:GⅡ.4 New Orleans 2009  
8:GⅡ.4 Sydney 2012、9・10:GⅡ.2、11・12:GⅡ.17

平成 30 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

## 抗ノロウイルス活性のある化合物の探索

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	中村 麻子	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
研究分担者	上間 匡	国立医薬品食品衛生研究所

### 研究要旨

ノロウイルス (NoV) の感染予防対策に寄与する化合物の探索を目的に、ネコカリシウイルス (FCV) およびマウスノロウイルス (MNV) を用いた抗 NoV 活性を有する化合物の活性評価を行った。天然生理活性物質 235 化合物を対象に抗 NoV 活性の評価を行った結果、1 化合物 (化合物 A とする) が両ウイルスに対する抗ウイルス活性を示した。次に化合物 A について精査したところ、細胞生存率を指標とする抗ウイルス活性は両ウイルスに対して  $18\mu\text{M}$  で最大を示した。また、濃度依存的なウイルス感染価の抑制がみられ、24 時間の培養で FCV と MNV それぞれに対して  $14.4\mu\text{M}$  で  $4.56\log_{10}$ 、 $5.83\log_{10}$  感染価が抑制された。作用機序はウイルス粒子への直接的なものではないことが示唆された。

### A. 研究目的

ノロウイルス (NoV) は主に冬季に流行する食中毒や感染性胃腸炎の主要な原因ウイルスである。NoV の感染予防には手指や調理器具の洗浄、あるいは糞便や嘔吐物によって汚染された環境の消毒が重要である。NoV を不活化させるには次亜塩素酸ナトリウムなどの消毒剤が挙げられるが、人体への影響から手指等への使用が難しく、より安全かつ効果の高い消毒剤が望まれている。NoV は培養が困難であることから、NoV に対する薬剤の不活化評価を行うには培養可能な NoV 代替ウイルス

が使用されているが、薬剤への感受性や性状の違いから複数種の代替ウイルスを使用することが推奨されている。

そこで、NoV の感染予防対策に資する化合物の探索を目的として、NoV 代替ウイルスであるネコカリシウイルス (FCV) 及びマウスノロウイルス (MNV) を用いたスクリーニング系により抗 NoV 活性を有する化合物の探索と、その活性評価を行った。

### B. 研究方法

#### 1. 材料

抗 NoV 活性を評価する化合物として、

天然生理活性物質ライブラリーを購入し、235 化合物について評価を行った。NoV 代替ウイルスとして FCV-F9 株および MNV を使用し、それらのウイルスを接種する細胞として CRFK 細胞および RAW264.7 細胞をそれぞれ用いた。

## 2. 抗 NoV 化合物のスクリーニング

抗 NoV 活性を有する化合物のスクリーニングは Ohba らの方法 (J. Antibiotics, 70, 443-447, 2017.) に基づいて行った (図 1)。即ち、評価を行う化合物を 100  $\mu$ M、10  $\mu$ M、1  $\mu$ M および 0.1  $\mu$ M の 4 段階に細胞培地を用いて希釈調製し、100TCID50/50  $\mu$ l に調整した FCV または MNV と等量混合し、37°C、5%CO<sub>2</sub> 条件下で 30 分間静置した。混合液を CRFK 細胞または RAW264.7 細胞を播種した 96 穴プレートに 120  $\mu$ l/well ずつ接種し、同条件下で 1 時間培養した。培養後、PBS(-)で洗浄し、5%FBS 加 EMEM (CRFK 細胞) または 5%FBS 加 DMEM (RAW264.7 細胞) を 150  $\mu$ l/well ずつ加えて培養・観察を行った。抗ウイルス活性の評価は細胞変性効果 (CPE) の有無により判断した。

## 3. 細胞生存率の測定

化合物を 360  $\mu$ M から 2.8  $\mu$ M まで 2 倍段階希釈で調製後、スクリーニングと同様の手順でウイルス液と反応させ、培養した (図 1)。Cell Counting Kit-8 (同仁化学研究所) を用いて生細胞数を測定し、細胞生存率 (各濃度における生細胞数/コントロール [化合物およびウイルス液を非接種] の生細胞数) を指標として抗 NoV 活性を評価した。

同時に、各希釈濃度における化合物の CRFK 細胞および RAW264.7 細胞に対する

毒性を評価した。

## 4. ウイルス感染価抑制効果の測定

化合物が FCV、MNV に与える感染価抑制効果を測定した (図 1)。即ち、化合物を 14.4  $\mu$ M、7.2  $\mu$ M、3.6  $\mu$ M、0  $\mu$ M (細胞培地のみ) に希釈調製し、スクリーニングと同様の方法でウイルス液と反応させ、培養を行った。24 時間後に培養上清を回収し、TCID50 assay によりウイルスの感染価を測定した。

## 5. 化合物の作用機序の推定

化合物の作用がウイルス粒子への直接の作用か、または宿主細胞に作用して増殖を抑える作用か検討を行った。即ち、10  $\mu$ M の化合物または細胞培地のみを、それぞれ FCV または MNV と 1 時間反応後、遠心式フィルター Amicon Ultra-0.5 (メルクミリポア) で化合物を除去した。回収したウイルス液の感染価を TCID50 assay により測定し、両者の感染価を比較した (図 1)。

(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. 抗 NoV 化合物のスクリーニング結果

天然生理活性物質 235 化合物について評価した結果、23 化合物が FCV または MNV に対する抗ウイルス活性を示した。このうち 19 化合物が 100  $\mu$ M、4 化合物が 10  $\mu$ M 以下の濃度で CPE を抑制した。13 化合物が FCV に対して、9 化合物が MNV に対して抗ウイルス活性を示し、1 化合物 (化合物 A とする) が両ウイルスに対する抗ウイルス活性を示した。

## 2. 細胞生存率を指標とした抗 NoV 活性の評価

化合物 A について抗 NoV 活性の評価を行った。細胞生存率は FCV、MNV それぞれにおいて 18  $\mu$ M で最大を示したが、それを超える濃度では低下した (図 2, 上)。細胞毒性は CRFK 細胞に対して 18  $\mu$ M、RAW264.7 細胞に対して 11.3  $\mu$ M を超える濃度でみられた (図 2, 下)。

## 3. ウイルス感染価抑制効果の測定結果

化合物 A によるウイルス感染価抑制効果の結果を示した (図 3)。化合物 A の濃度依存的な感染価の抑制がみられた。抑制効果は 14.4  $\mu$ M で最大を示し、FCV に対して 4.56log<sub>10</sub>、MNV に対して 5.83log<sub>10</sub> の感染価の抑制がみられた。

## 4. 作用機序の推定

遠心式フィルターで化合物を除去後のウイルス感染価を比較したところ、10  $\mu$ M の化合物 A と細胞培地のみ添加時の感染価に差は現れなかった (図 4)。

## D. 考察

本研究において天然生理活性物質から探索を行った結果、23 化合物が抗ウイルス活性を示した。このうち化合物 A のみが FCV および MNV 両ウイルスに対して抗ウイルス活性を示した。そこで、化合物 A について細胞生存率を指標とした抗ウイルス活性を測定したところ、濃度依存的な細胞生存率の上昇が認められ 18  $\mu$ M で最大を示した。しかし、細胞毒性が付近の濃度 (CRFK 細胞: 18  $\mu$ M 以上、RAW264.7 細胞: 11.3  $\mu$ M 以上) でみられた。そこで細胞毒性の影響が少ない低濃度域における化合物 A のウイルス感染価抑制効果を

検討したところ、FCV および MNV に対して有意な感染価の抑制がみられ、化合物 A の抗 NoV 活性が確認された。抗 NoV 活性を持つ化合物は種々の報告があり、天然由来の化合物では柿抽出物 (タンニン) や紅茶に含まれるテアフラビン類が知られている。テアフラビン類の一つである Theaflavin digallate は FCV に対して 25  $\mu$ M、MNV に対して 50  $\mu$ M での抗ウイルス効果 (最小有効濃度) が報告されている。既報の化合物と同等以上の効果がみられたが、細胞毒性をいかに抑えるか今後検討が必要である。

抗ウイルス剤にはウイルス粒子に直接作用する化合物、または宿主細胞に作用して増殖を抑える化合物 (ウイルスの接着、侵入、複製、放出のいずれかのステップに作用) が考えられ、前者は消毒剤、後者は治療薬としての応用が主に期待される。化合物 A は遠心式フィルターの処理によっても感染価の減少がみられなかったことから、ウイルス粒子への直接的な作用ではないことが示唆された。よって治療薬としての応用が期待されるが、詳細な作用機序は明らかになっていないため今後の課題である。

## E. 結論

天然生理活性物質 235 化合物について抗 NoV 活性を評価したところ、23 化合物が FCV または MNV に対する抗ウイルス活性を示した。

化合物 A は FCV および MNV 両方に顕著な抗ウイルス活性を有し、その作用機序はウイルス粒子への直接的なものではないことが示唆された。

今後も、抗 NoV 活性を示した化合物の精査や新たな化合物のスクリーニングを行い、NoV の感染対策に役立つ化合物の検証を進めることが重要である。

suspected outbreak in Japan., Jpn J Infect Dis, 71 (5) :390-392 (2018)

2. 学会発表  
なし

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Takayuki Kobayashi, Hideaki Yoshitomi, Asako Nakamura, Yuki Ashizuka, Jumboku Kajiwara and Mamoru Noda: Genetic characterization of rarely reported GI.Pc\_GI.5 norovirus strain detected from a foodborne

## 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

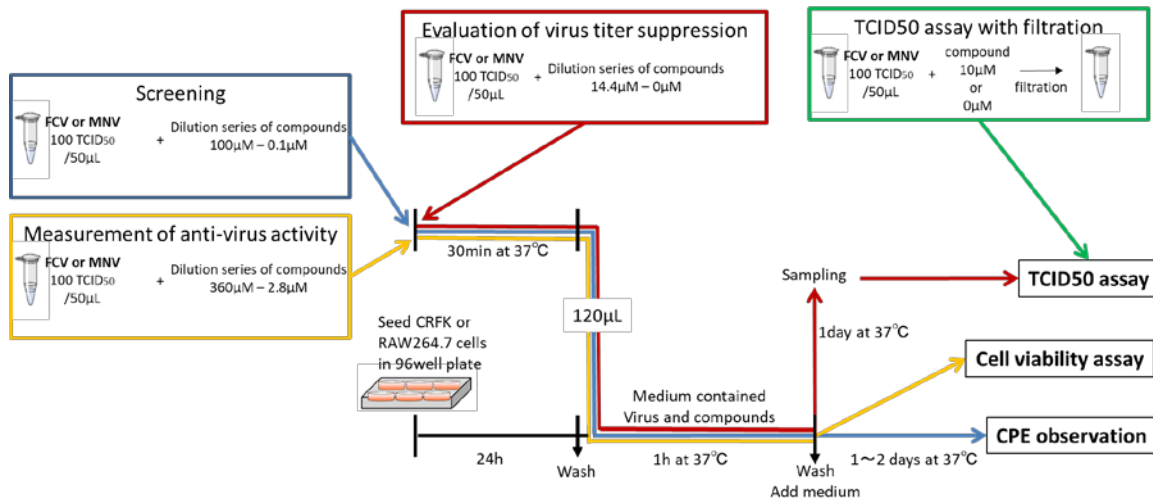


図1 細胞を用いた化合物の抗 NoV 活性評価方法

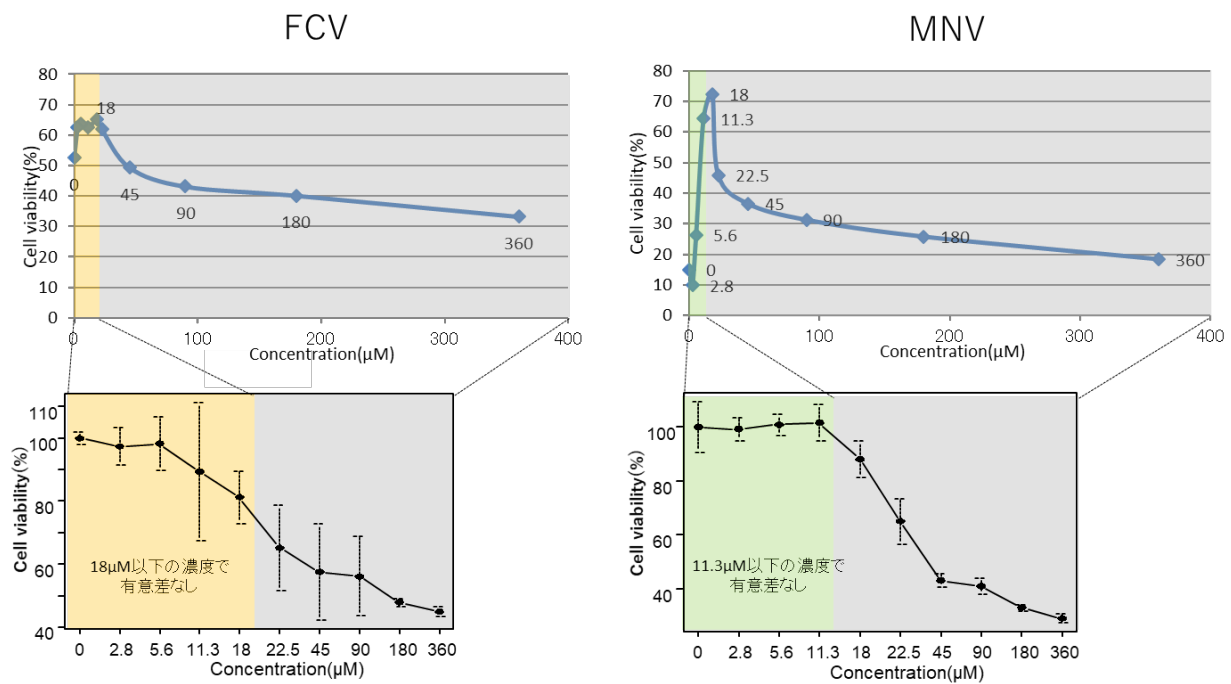


図2 化合物 A を添加時の細胞生存率の測定  
 上：ウイルス+化合物 A (0-360μM) 添加時の細胞生存率  
 下：細胞毒性試験 (化合物のみ添加)

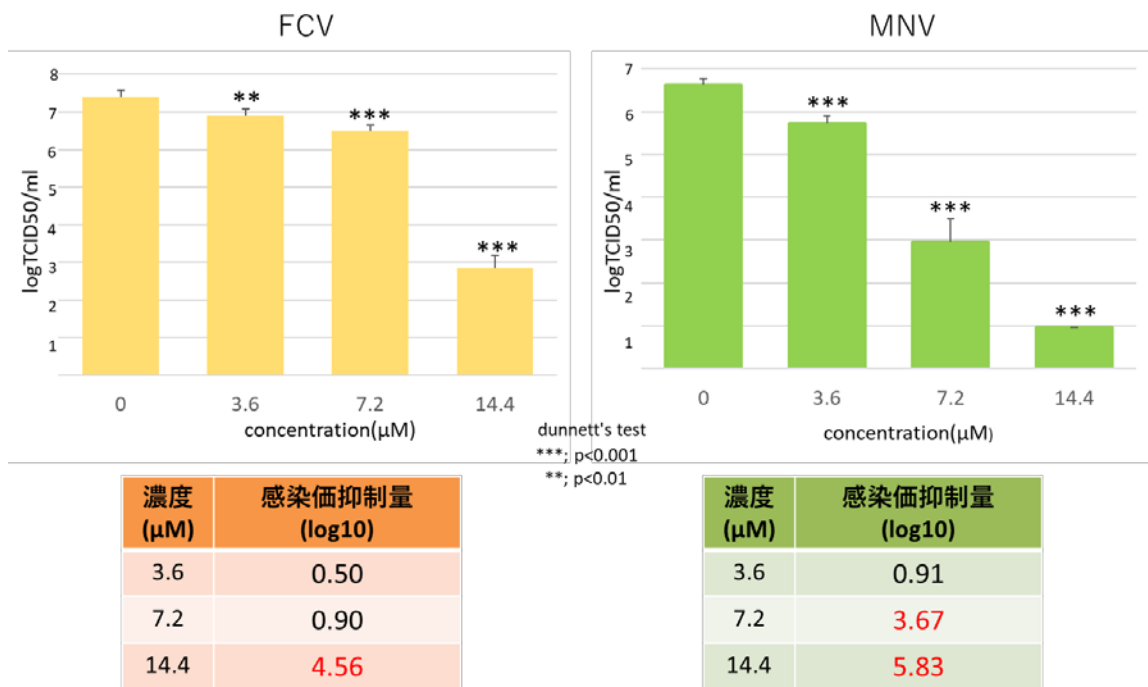


図3 化合物 A によるウイルス感染価抑制効果の測定結果



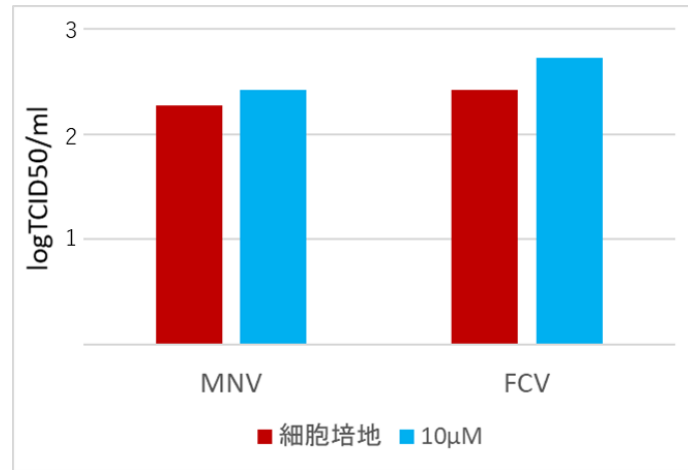


図4 化合物Aの作用機序の推定（フィルター処理後のウイルス感染価の比較）