

厚生労働科学研究費補助金
食品の安全確保推進研究事業

ウイルスを原因とする食品媒介性疾患の制御に関する研究

平成 28～30 年度 総合研究報告書

研究代表者 上間 匡

平成 31 (2019) 年 3 月

I 総合研究報告

平成 28～30 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」

総合研究報告

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

ウイルス性食中毒は依然多発し、その多くは食品取扱者からの食品の二次汚染を原因とすることから、その汚染防止対策の確立が急務である。本研究ではノロウイルス、サポウイルス、E 型肝炎ウイルス等のウイルスによる食品媒介性疾患の発生及び被害の拡大を効果的に低減するための手法の確立を目標とする。食中毒発生時の迅速な原因究明や蔓延防止のための措置を講じるためには、原因食品や感染経路を特定するための食中毒調査体制の強化が必要であることから、食品からの簡便なウイルス検出法の改良・開発、網羅的ゲノム解析法等のウイルス性食中毒検査への応用等、食中毒の原因食品や感染経路の特定率を向上させるための研究を行う

1. 食中毒検査体制の強化に関する研究

3 年間にわたり、パンソルビントラップ法や、リアルタイム PCR 法の改良による、食品検査の精度管理および、臨床検体、環境検体等からの食品媒介ウイルスの検索等を実施した。

自治体の協力を得てノロウイルス定量検査の外部精度管理を実施した結果、食品検体を用いた精度管理手法について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、新規流行遺伝子型 GII. 17 への対応や、試薬のロット差による回収率低下への対応、食品からのウイルスの回収率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など、広く実用される際に問題となりうる点について改良を行った。

食品検体やふき取り検体からのノロウイルス検出の改良について検討し、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示した。

食中毒および集団胃腸炎事例について、感染経路究明における調理従事者および患者等に由来するウイルス遺伝子解析の有用性について検討した。世界的な流れとして、臨床検体から分離されるウイルスの詳細な分子疫学解析のためには、通知法に従った N/S 領域の約 300 塩基よりも長い、VP1 全長や、RdRP 領域の解析が必要とされているが、協力自治体において通知法に従った領域と、VP1 や RdRP 領域の塩基配列、遺伝子型別等の解析結果を比較し、事例における感染経路の特定等については通知法に従った N/S 領域の解析でも多くの事例で対応可能であることが示された。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。

下水流入水や下水放流水、河川に生息するシジミ、市販カキ等について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、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。環境検体からは、感染症サーベイランスによって報告がほとんどないサポウイルス (SaV)、アストロウイルス、アイチウイルス、A 型肝炎ウイルス等の遺伝子も検出され、特にサポウイルスは通年検出された。食中毒報告や、感染性胃腸炎報告には現れない

2 調理従事者からの二次汚染防止に関する研究

調理従事者の手洗いにおけるウイルス除去効果の向上、抗ウイルス活性化化合物、調理等によるウイルスの不活化、消毒剤によるウイルス不活化評価方法および、腸管系ウイルスの培養系確立について検討を行った。

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、両ウイルスに対して活性を示す化合物を得た。

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。

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 種類と感受性細胞株 2 種を選定し、消毒剤等によるウイルス不活化評価の標準法の基本プロトコルを作成した。

ヒトノロ、サポウイルスの一般細胞株での培養条件を検討した結果、1 株の細胞でサポウイルスの非常に良好なウイルス増殖性が認められた。また、これまで増殖確認ができなかったウイルス RNA 低コピーの臨床検体由来のウイルス株でも、培養上清でのウイルス RNA 増大が確認できるなど、ヒト腸管系ウイルスの一般細胞での培養系確立の可能性が示唆された。サポウイルスはノロウイルスと同じカリシウイルス科に属する腸管系ウイルスであり、培養が成功すれば、ノロウイルスの培養についても有用な知見を与えると思われる。

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

野田 衛	国立医薬品食品衛生研究所
------	--------------

研究協力者

岡 智一郎
鈴木 達也
国立感染症研究所
一般財団法人食品薬品安全センター

中阪 聡亮
吉澄 志磨
後藤 明子
大久保 和洋
石田 勢津子
北海道立衛生研究所

筒井 理華
福田 理
坂 恭平
青森県環境保健センター

秋野 和華子
佐藤 寛子
秋田県健康環境センター

清水 優子
牛島 廣治
日本大学・医学部・微生物学教室

高橋 知子
岩手県環境保健研究センター

佐藤 直人
川上 修央
白澤 彰
藤森 亜紀子
佐藤 卓
高橋 雅輝
岩渕 香織
梶田 弘子
植木 洋
坂上 亜希恵
小泉 光
菅原直子
田村 務
林 真由美
西田 晶子
渡部 香
広川 智香
新井 礼子

宮城県保健環境センター

新潟県保健環境科学研究所

滝澤 剛則
富山県衛生研究所

名古屋 真弓
稲崎 倫子
板持 雅恵
嶋 一世
長谷川 澄代
宗村 佳子
永野 美由紀
小田 真悠子
木本 佳那
森 功次

東京都健康安全研究センター

奥津	雄太	
秋場	哲哉	
浅倉	弘幸	
新開	敬行	
清水	智美	川崎市健康安全研究所
若菜	愛澄	
清水	英明	
米山	朋那	神奈川県厚木保健福祉事務所大和センター
森口	真理子	神奈川県衛生研究所
入谷	展弘	大阪健康安全基盤研究所
山元	誠司	
改田	厚	
阿部	仁一郎	
上林	大起	
平井	有紀	
江川	和孝	
馬場	孝	
久保	英幸	
小林	和夫	
三好	龍也	堺市衛生研究所
中谷	誠宏	
岡山	文香	
福井	陽子	
内野	清子	
山本	憲	
谷澤	由枝	広島県立総合技術研究所保健環境センター
重本	直樹	
山本	美和子	広島市衛生研究所
藤井	慶樹	
福永	愛	
則常	浩太	
兼重	泰弘	
八島	加八	
松室	信宏	
坂本	綾	
小林	孝行	福岡県保健環境研究所同上
吉富	秀亮	
中村	麻子	
芦塚	由紀	
梶原	淳睦	
小菅	大嗣	麻布大学
永嶋	俊樹	
三元	昌美	国立医薬品食品衛生研究所
永田	文宏	

(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検査機関を対象として、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。

平成 28 年度は検体 7 種〔高濃度検体：3 種，低濃度検体：3 種（3 種はいずれも同一濃度）および陰性検体：1 種〕、および標準 DNA 溶液を調査検体として配布し、定量検査を各検査機関にて実施した後、回収した結果の解析を行った。平成 29 年度より、より実際の食品検体に近づけるためきな粉を基材として食品検体を作製した。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。平成 30 年度は、平成 29 年度と同様の検体を用い、その再現性について検討した。

(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・トラップ法の実用面における課題への対応

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。

② ふき取り検体からのノロウイルス検出法の改良及びウイルスモニタリングに関する研究

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

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。

④ カキからのノロウイルス検出のためのnestedリアルタイムPCR法の改良

検査法を改良することを目的として、1stPCRにおけるプライマー濃度やDNA合成酵素の検討、非特異的増幅の有無の確認、プライマー及びプローブの検討等を行った。

(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

ブタサポウイルスの培養系を参考に、異なる細胞およびコール酸の組み合わせで、培養系を構築し、サポウイルス陽性

材料を添加し、培養を試みた。5～8日培養後、培養上清を回収し、ウイルスRNA量を測定した。また、接種材料中の感染性を持つウイルス量を推定した。

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。

Caco-2細胞、INT407細胞、HT29/219細胞の3種類の培養細胞についてウシ胆汁、ブタ胆汁酸、5種類のコール酸（CA、DCA、GCA、GCDCA、CDCA）、マレイン酸、オレイン酸について、細胞毒性を示さない最大の添加量を調べた。

(4) 食中毒事例、胃腸炎事例、下水および食品等二枚貝からの食品媒介ウイルスの検出と遺伝子解析

① 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

施設フキトリまたは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。

2016年9月から2018年12月までの3シーズンにおけるNoV流行について分子疫学的解析を行った。

2016-2017～2018-2019シーズンの期間に国産市販生食用カキ16ロットについてNoVおよびA型肝炎ウイルス（HAV）の検索、うち13ロットについてはさらにサポウイ

ルス（SV）およびE型肝炎ウイルス（HEV）の検索を行った。

② カキからのノロウイルス検出および検出法の検討，ならびにノロウイルスGⅡのORF2全長遺伝子解析手法に関する検討

カキおよびヒトから検出されたノロウイルス（NoV）の遺伝子型を比較した。

二枚貝中には遺伝子検査を阻害する物質が存在し，NoV等の検出感度を低下させている可能性がある。カキ中腸腺および対照群としてDDWへNoVを添加した回収試験を行った。

カキからのNoV検出感度の改良を目的として，アセトン添加法による検討を行った。また，ポリエチレングリコール（PEG）沈殿法における至適アミラーゼ溶液添加量を検討した

NoV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，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。

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

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，その一致・不一致の情報を感染源等の判断の裏付けとして使用している。この比較

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。今回，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（1塩基違いの検体あり）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）で比較した場合でも同様の結果になるかどうかの検証を行った。

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

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のため，岩手県におけるノロウイルス集団発生事例の動向の把握と，集団発生事例の原因となりうる不顕性感染者の実態調査を行った。

⑥ 二枚貝のノロウイルス検出状況及びノロウイルスの流行状況

川崎市内で流通する二枚貝及び市内の河川に生息する二枚貝についてノロウイルス（NoV）検査を行うとともに，ヒトにおけるNoVの流行状況について解析し，二枚貝の保有ウイルスとの関連性について調査を行った。

⑦ 二枚貝および下水からのノロウイルスの検出と胃腸炎患者からのノロウイルスの検出状況

2016年1月～2018年8月の期間，秋田県内で流通しているカキ等二枚貝についてノロウイルス（NoV）の検出を行った。

2018年4月～12月には下水（各月1回採水）についてもNoVの検出を行った。

⑧ 流入下水における食品媒介性ウイルスの挙動

2016年7月から2019年1月の期間に週1回の頻度で採取した流入下水135検体を対象として、ノロウイルス（NoV）およびサポウイルス（SaV）遺伝子については定量的に、A型肝炎ウイルス（HAV）およびE型肝炎ウイルス（HEV）遺伝子については定性的に検出を行った。

⑨ ノロウイルスふき取り調査及び下水サンプルを用いた腸管感染ウイルスの流行解析

調理施設におけるノロウイルス（NoV）の汚染状況や不顕性感染も含めた調理従事者におけるNoVの感染実態を明らかにすること及びふき取り検査法の検討を行うため、調理施設のトイレ等のふき取り調査を行った。また、カキなどの二枚貝の重要な汚染源である下水中のウイルスについて調査を行い、腸管感染ウイルスの流行解析を行った。

⑩ 流入水中ノロウイルスの定量および市販ノロウイルス検出キットの反応性評価

ノロウイルス（NoV）の流行状況を把握するため、環境検体である終末処理場流入水からのNoV検出を行った。

調理従事者の健康管理対策の一環として、市販NoV検出キットについて遺伝子型毎の検出率について評価した。

⑪ メタゲノム解析による下水からのノロウイルス・サポウイルスの検出

2011年から2013年に富山県で採取した下水流入水について次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析を行い、ノロウイルスとサポウイルスの検出を試みた。

⑫ 集団発生例での遺伝子型の解析

2016/17シーズンの東京都におけるノロウイルス（NoV）を原因とした食中毒疑い等の集団発生事例210例において、検出された遺伝子型を解析した。

2. 調理従事者からの二次汚染防止に関する研究

(1) 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

ロウイルスに感染した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い。そこで、トイレにおける手指汚染を簡易に除去する方法として、トイレを利用する前に水溶性ポリマーでコーティングして、水とともにウイルス汚染を簡易に除去する方法を考案し、その有効性を評価した。水溶性ポリマーとしてカルボキシメチルセルロースナトリウム（CMC）やポリエチレングリコール（PEG）を使用した。

(2) 抗ノロウイルス活性のある化合物の探索

NoVの感染予防対策に寄与する化合物の探索を目的に、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

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

次亜塩素酸ナトリウム、酸化剤などの不活性化効果を比較した。

消毒剤のウイルスに対する不活性化効果判定試験法のガイドライン作成に必要な基礎データを得るために、評価試験に使用するウイルスの候補として想定した6種類のウイルス(ネコカリシウイルス1株, エンテロウイルス71型, ヒトパレコウイルス1型, コクサッキーA6型ウイルス, コクサッキーB3型ウイルス, コクサッキーB5型ウイルス)について, NaClO (原液有効塩素5%), エタノール (EtOH 99.5%), 過酸化水素 (H₂O₂, 原液30%), 炭酸ナトリウム (Na₂CO₃, 0.5~1%) に対する感受性を調べ, ノロウイルスの代替ウイルスとしての評価を行った。

ヒトノロウイルス代替ウイルスの選定において, Coxsackievirus typeA6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

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

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。

(5) ノロウイルスの不活化に関する研究

不活化試験でノロウイルスの代替として用いられているネコカリシウイルスとマウスノロウイルスの系を用いて, 消毒剤のウイルス不活性化効果 (電解水・ファインバブルの相乗効果) について検討した。

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

(6) 食品等の汚染ウイルス量の推定

2017 年 1 月に和歌山県御坊市で発生した磯和えによる集団食中毒事例において, 原因食品とされる磯和えから real time PCR によりノロウイルス (NoV) 遺伝子が検出され, 磯和えに含まれる NoV 遺伝子のコピー数は 1g あたり 125 コピーと推定された。本研究ではこの値を基に喫食されたウイルス量および汚染源と推定される感染者の糞便中のウイルス量の推定を行った。

(7) 手洗いの実施状況の検証

食品取扱業者における手洗いの実施状況等について調査を実施した。

(8) ノロウイルス感染における臨床症状の把握

2014 年に発生したノロウイルス食中毒事件の調査時に独自の患者調査票を用い, 対象者に症状に関する詳細な聞き取り調査を実施し, その結果を集計・分析した。

(9) ノロウイルスの排便後の拡散の実証実験

排便後に手指や臀部が汚染された場合, その後どのように汚染が拡大していくのか実証実験を行った。また, トイレ使用

時における手袋の着用が、二次汚染防止に有効であるかを検証した。

(倫理面への配慮)

本研究において、ヒトから提供を受けた検体(便検体)は感染症法に基づく感染症発生動向調査、食品衛生法に基づく食中毒原因究明調査等の行政検査として採取されたものである。その試料の取り扱いに関しては、試料提供者、その家族の人権、尊厳、利益が保護されるよう十分に配慮した。また提供試料、個人情報厳格に管理、保存した。一部の研究においては各研究機関において研究倫理審査委員会に申請し、承認を得た。

C. 研究結果

1. 食品等からのウイルス検出法および遺伝子解析法の開発

(1) 食品のウイルス検査の精度管理

平成28年度は、検量線の濃度範囲を 10^1 コピーまで拡張しても、相関係数は 10^3 コピー以上の濃度範囲の場合と同等であった。また、標準DNA溶液において1機関で高めの値を報告したが、その他の検査試料では全ての検査機関で正しく検査が実施されているものと考えられた。これらの結果のばらつきは非常に小さいものであった。平成29年度は、標準DNA溶液では実測値における変動係数が0.009と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。これに対して、ウイルス懸濁液では変動係数が約0.1であった。さらに今回初めてきな粉を基材とした食品検体を採用し、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0.3~0.4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0.2~0.3となった。平成30年度は、標準DNA溶液はやや変動係数が大きくなったものの精度の良いことが確認された。また、ウイルス懸濁液も同様の結果が得られたが、食品検体においては、変動係数が約0.6と大きくなった。

(渡辺研究分担報告)

(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・トラップ法の実用面における課題への対応

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。

(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及びウイルスモニタリングに関する研究

一般的にふき取り検体からのノロウイルス検出には、超遠心や PEG 沈殿などのウイルスの濃縮操作を行う。開発した方法（改良法）は、①ふき取り時に綿棒等に浸す液、及びウイルス回収の際の再浮遊液に 0.3% Zwittergent 加 PBS(-) または 2.5% Tween20 加 PBS(-) を用い、少量(0.7-0.8ml)の再浮遊液に回収する、②ふき取り液からの核酸抽出には、QIAamp Viral RNA Mini Kit を用いる場合は、試量を 140 μ l \times 2 にし、核酸溶出量を 50 μ l にする、もしくは NucleoSpin Virus を用いる場合は、試量を 400 μ l にし、核酸溶出量を 30 μ l にする、③検出は Nested-リアルタイム PCR 法で行い、2nd PCR のサイクル数を 30 回、Cp 値 25 以下を陽性とする、等によりウイルス濃縮工程を省略しても効率的にノロウイルスを検出することができた。ふき取り検体からのノロウイルス検出限界は、100cm² あたり 10³ ゲノムコピー程度であった。

この改良法を用いて公共施設トイレ周辺のふき取りによるノロウイルスモニタリング調査を行ったところ、便座裏から高率にノロウイルスが検出された。

(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)

④ カキからのノロウイルス検出のための nested リアルタイム PCR 法の改良

カキ検体から検出されたノロウイルス GI の塩基配列を基に新たに設計したプローブ (RING-TP-n) を用いることで、カキ中のノロウイルス GI の定量値が有意に増加し、定量値が低くなった主要な原因はプローブと検体中のノロウイルス GI の塩基配列のミスマッチであることが明らかになった。一方、RING-TP-n を使用すると GI 陽性コントロール (PC) DNA では定量値が低下した。そこで RING-TP-n, RING1-TP-(a), TP-(b) の各プローブを混合した系を検討した結果、カキ検体中のノロウイルス GI の定量値は RING-TP-n 単独の場合には及ばないものの、PC の定量値は増加し、検体によらず全体的に良好な定量値が得られた。

(上間研究分担報告)

(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

供試した細胞とコール酸類の組合せにより、そのいくつかの培養上清にウイルス RNA の強いシグナルが確認された。また別法により RNA コピー数を測定したところ経時的な増加が認められ、増加率は 10³~10⁴ 倍であった。これらはヒトサポウイルス GI, GII, および GIV で確認された。

接種材料別では接種材料を精製水調整したものではウイルス RNA の増加は認められず、分離培養用培地で調整したものではウイルス RNA の増加が認められるものがあつた。

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)

Caco-2, INT407, HT29/219 の 3 種類の培養細胞についてウシ胆汁, ブタ胆汁酸, 5 種類のコール酸 (CA, DCA, GCA, GCDCA, CDCA), マレイン酸, オレイン酸について, 細胞毒性を示さない最大の添加量を決定した。

(上間研究分担報告)

(4) 食中毒事例, 胃腸炎事例, 下水および食品等二枚貝からの食品媒介ウイルスの検出と遺伝子解析

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, 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

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。

2016-2017 シーズンに保育所や小学校などで子どもを中心とした NoV GII.2 の大きな流行が認められた。また, この 3 シーズンは NoV GII.4 の検出数は少なかったが, 2016 年 1 月および 3 月に発生した事例から検出された GII.4 株は, これまで報告のないキメラウイルス GII.P16-GII.4 Sydney_2012 であった。

NoV は 3 ロット (3/16, 18.8%), SV は 1 ロット (1/13, 7.7%) から検出された。HAV および HEV は検出されなかった。

(入谷研究協力報告)

② カキからのノロウイルス検出および検出法の検討, ならびにノロウイルス GII の ORF2 全長遺伝子解析手法に関する検討

2016/17 シーズンは, カキからは Hu/GII /JP/2015/GII.P17-GII.17/Kawasaki308 に近縁の GII.17 のみが検出された。一方で, ヒトからは全国規模の流行が認められた GII.2 が最も多く検出された。

中腸腺からの NoV 回収率は, 対照群と比較して約 100 分の 1 以下の成績となった。

中腸腺 1g に対し 250 μ l のアセトンを追加した場合に, 検出率の向上が認められた。また, 中腸腺 1g に対し 10 μ l のアミラーゼ溶液を追加した場合に最も検出率が高かった。

検体からの RNA 抽出工程の改良, 逆転写反応系の検討, 各種プライマーの設計により, 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 全長遺伝子を解析する手法を確立した。

(山本研究協力報告)

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

4 事例 (事例番号 2, 8, 12 および 15) で調理従事者由来株と発症者由来株に数塩基の違いが見られた。中でも, 1 塩基異なるものが複数例確認された。

(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

NoV 検出用プライマー内配列が事例内の他の検体と一致していた検体の大多数は, RdRp-VP1 全長の比較でも一致またはほぼ一致 (1 塩基違い) しており, 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、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

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、保育園では遺伝子型等の多様性がみられ、高齢者施設では、食中毒の1例(G II.17)を除き、すべてG II.4によるものであった。2016/17 シーズンに保育園で多発したG II.2による集団発生は、2017/18 シーズンは保育園に加えて、小学校、高校、障害者施設の若年層での発生も複数みられた。

2014年9月～2017年11月の流入下水から検出されたノロウイルスの遺伝子型は、同時期の集団発生では検出されない遺伝子型も多数みられた。

同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。

(高橋研究協力報告)

⑥ 二枚貝のノロウイルス検出状況

市内で流通する生食用生カキのNoV保有率(陽性率)は33.3%(4/12検体)であり、25.0%(3検体)から遺伝子型別不能のGIが検出された。加熱用生カキからNoVは検出されなかった(0/12検体)。

市内で流通するシジミの陽性率は4.2%(2/48検体)と比較的低かったものの、生食又は加熱不十分な状態で喫食することによってNoVに感染する可能性があるため、注意が必要である。

河川のシジミから検出されたGI群と、ヒトから検出された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であり、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で、GII群が多くを占めていた。

(清水研究協力報告)

⑦ 二枚貝および下水からのノロウイルスの検出と胃腸炎患者からのノロウイルスの検出状況

2015/2016 シーズンの生カキからはGII.3, GII.4, GII.17, GI.2, GI.4, 生アサリからはGII.6, GI.7が検出された。2016/2017シーズンの生カキからはGII.2, GII.3, GII.4, GII.17, GI.2, GI.4, 生アサリからはGII.2, GI.7が検出された。

2017/2018シーズンの生カキからはGII. 2, GII. 4, GII. 17, GI. 1, GI. 2, 生アサリからはGII. 4が検出された。パック入りカキの浮遊液からは、2016年1月および2017年3月に同一海域においてGII. 17が検出された。2016年12月～2017年3月に生カキから検出されたGIIの定量値(単位:コピー数/g中腸腺)はすべて 10^2 以上であった。また、2018年6月、7月の岩ガキにおいては、GII, GIともに 10^2 以上である個体が多く存在していた。2016年11月～2017年4月に生アサリから検出されたGIIの定量値は、いずれも 10^2 以上 10^3 未満であった。GIの定量値は 10^1 以上 10^2 未満であった。

下水から検出された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4月から12月の間、GI. 1, GI. 2, GI. 3, GI. 5, GI. 6の5種類が検出された。

2016年1月～2018年8月の期間、秋田県の食中毒事例は5事例であり、検出された遺伝子型はGII. 2, GII. 4, GII. 17であった。また、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が最も多かった。

(斎藤研究協力報告)

⑧ 流入下水における食品媒介性ウイルスの挙動

NoVおよびSaVは流行期および非流行期に係わらず年間を通してウイルス遺伝子が検出された。また、分子疫学的解析の結果、流入下水から検出されたウイルス遺伝子は地域における胃腸炎の流行と

密接に関連していることが明らかになった。HAVは全国的に患者報告が増加した時期である2019年1月第1週に採取した検体からのみ遺伝子が検出された。さらに、HEVは調査期間中9検体から遺伝子が検出され、分子疫学的に解析した結果、検出株はすべて人獣共通感染症株の3型であった。

(植木研究協力報告)

⑨ ノロウイルスふき取り調査及び下水サンプルを用いた腸管感染ウイルスの流行解析

ふき取り調査では、NoV遺伝子は検出されなかった。

下水調査では、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た。NoV遺伝子量は、11月～2月の感染性胃腸炎患者の報告数と相関がみられていたが、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が少数にもかかわらず、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。

下水サンプルからA型肝炎ウイルスが検出された。

(三好研究協力報告)

⑩ 流入水中ノロウイルスの定量および市販ノロウイルス検出キットの反応性評価

2015年11月から2017年10月までの期間における感染性胃腸炎報告数とNoV検出量の動態に関連が認められた。

一部のキットでGII. 2, GII. 6に対する反応性が低いものがみられた。

(小林研究協力報告)

⑪ メタゲノム解析による下水からのノロウイルス・サポウイルスの検出

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

(滝澤研究分担報告)

⑫ 集団発生例での遺伝子型の解析

GII.2が65.7% (138/210) の事例から検出され最多となり、次いでGII.17が11.9%(25/210)、GII.4が9.0%(19/210)から検出された。NoVの検出はシーズン当初の11月から急激に増加し12月に検出がピークとなった。2017年2月には、学校給食で提供された「刻みのり」を原因とした大規模な食中毒が東京都内で4事例発生したが、その遺伝子型はGII.P17_GII.17であり事例間および刻みのりと患者間でその配列は一致した。

(宗村研究協力報告)

2. 調理従事者からの二次汚染防止に関する研究

(1) 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

7%PEG 85%エタノール溶液、3%CMC 45%エタノール溶液の塗布が墨汁の除去に有効で、糞便上清に含まれるノロウイルス

による汚染も低減することが可能であった。CMCをコーティングした実際の手洗いを想定した実験では、水洗いのみでハンドソープによる手洗いと同等の汚染低減効果があった。

水溶性ポリマーをウイルスの汚染前に手にコーティングしておくことで、汚染したウイルスを水洗いで簡易に除去することが可能であった。

(田村研究協力報告)

(2) 抗ノロウイルス活性のある化合物の探索

235化合物を対象に抗NoV活性の評価を行った結果、1化合物がFCVおよびMNVに対する抗ウイルス活性を示し、濃度依存的なウイルス感染価の抑制がみられた。

(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

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

供試した6種類のウイルスについてNaClO(原液有効塩素5%)、エタノール(EtOH 99.5%)、過酸化水素(H₂O₂, 原液30%)、炭酸ナトリウム(Na₂CO₃, 0.5~1%)に対する感受性を調べたところ、不活化効果は使用した株によって顕著な違いが認められた。今年度および昨年の結果を総合的に判断し、ネコカリシウイルスF9株、ネコカリシウイルスym-3株およびコクサッキーA6型ウイルスの3種類のウイルス株が代替ウイルスとして適当であると判断した。

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)

コクサッキーB5 型ウイルスを用いてエタノールによる不活化試験を実施し、CB5 が代替ウイルスとして適当か再評価を行った。その結果、局方エタノール、終濃度 80% (ウイルスと混合した時に 80%) のエタノールは、反応時間 60 秒で速やかに CB5 を 4log₁₀ 程度不活化し、CB5 がエタノールに対して高感受性であることが示された。

(上間研究分担報告)

(4) 加熱調理によるウイルスの不活化

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

シカ肉の加熱調理 (湯煎) において、60°C 30 分、55°C 60 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°C 1 分、68°C 5 分、65°C 15 分の加熱により 3log 以上の不活化が確認できた。

(上間研究分担報告)

(5) ノロウイルスの不活化に関する研究

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

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

(上間研究分担報告)

(6) 食品等の汚染ウイルス量の推定

一人あたり磯和えを 50g 食べたと仮定すると、一人が 6,250 コピーの NoV を摂取したと考えられた。また、汚染が生じた磯和えが約 800 人分程度と仮定すると、本事例に提供された磯和え全体として 5×10^6 コピーの汚染があったと計算された。一方、汚染源と推定される海苔の刻み作業を行った感染者の便中のウイルス量は、約 10^9 /g 程度であったと推定された。

(上間研究分担報告)

(7) 手洗いの実施状況の検証

ATP の値を手洗いの指標として用いることが可能であることが示唆された。また、各種手洗い洗剤の比較により、ATP 値と使用感の傾向は概ね一致しているこ

とが明らかになった。さらに、手洗いの検証を続けることにより、手洗いの改善傾向が認められた。

(上間研究分担報告)

(8) ノロウイルス感染における臨床症状の把握

ノロウイルス食中毒事件の調査時に独自の患者調査票を用い、対象者に症状に関する詳細な聞き取り調査を実施した結果、有症者にノロウイルス感染の特徴とされる下痢、嘔吐、発熱以外の症状が認められる例が少なくなく、軽症を含み、症状に多様性が認められた。一方、便性状の変化(下痢、軟便を含む)や胃部の違和感などは共通の症状として多くの有症者で認められた。

(野田研究分担報告)

(9) ノロウイルスの排便後の拡散の実証実験

排便後のお尻を拭く作業において手指が汚染された後、トイレトペーパーで肛門部を清拭し、衣服を整えた際に作業着に汚染が起こった。作業着(上着)を脱いでトイレを使用した場合、下着が汚染された。臀部に汚染があった場合、下着に浸透し下着表面に移行することが示された。手袋の装着は、肛門の清拭や身支度を整えることによる二次汚染の防止に有用であった。

(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

食品検体における変動係数が大きくな

った原因は、新たに作製した食品検体を用いたためと実施者が29年度と異なっていたことが、ばらつきが大きくなった原因と考えられた。また、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推察された。

(渡辺研究分担報告)

(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・トラップ法の実用面における課題への対応

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。

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/test/fixing_of_pansorbin.pdf」よりダウンロードできるように手配した。

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及びウイルスモニタリングに関する研究

今回の改良法は、検査時間や検出感度

の点からも優れた方法であることが明らかとなった。

流行期の公共施設のトイレは少なからずノロウイルスに汚染されていることが実証された。特に便座裏汚染率は調査した部位別で最も高く、ウイルス汚染量も 10^3 コピー以上あるので注意が必要である。また、ペーパーホルダーからノロウイルスが検出されたことより、ペーパーホルダーを介して二次感染が起こる可能性が示された。定点当たりの患者報告数が増加するとトイレ周辺のふき取りも陽性になっていたことから、トイレの汚染状況はノロウイルスの流行状況を反映していると考えられた。

(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

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。

(宗村研究協力報告)

④ カキからのノロウイルス検出のためのnestedリアルタイムPCR法の改良

nestedリアルタイムPCRにRING-TP-nを単独あるいは従来のプローブと混合して用いることで偽陰性の減少や、検査精度の向上が期待され、それに伴い生食用カキの安全性が向上すると考えられる。

(上間研究分担報告)

(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

ヒトサポウイルスにおいて初めて培養

上清中にウイルス RNA シグナルの増加、およびコピー数の経時的増加を認めた。

しかしながら継代によるウイルス RNA 増加はまだ認められておらず、初代培養上清からの超遠心法によるウイルス回収やその電顕像から考えられる要因を抽出し、現在検討を行っている。また、接種材料において、精製水で乳剤を調整したものにはウイルス RNA の増加を認めた検体はなく、分離用培地で調整したものにその増殖がみられる検体があった。このことから、接種材料の調整法に分離成功の可否が関連する可能性があり、詳細に検討する必要がある。

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。

(高木研究分担報告)

ノロウイルスやサポウイルスの培養に必要と考えられる胆汁成分等の添加可能(細胞毒性を示さない)濃度は、細胞により異なり、新たに細胞株を検討する際には、それぞれの細胞で培養条件を詳しく検討する必要がある。

(上間研究分担報告)

(4) 食中毒事例、胃腸炎事例、下水および食品等二枚貝からの食品媒介ウイルスの検出と遺伝子解析

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、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

今回、解析したすべての事例において調理従事者と患者の両者由来 NoV の遺伝子型、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。施設フキトリ検査は汚染経路の解明や原因施設の特定に有効な手段となりうることが示された。また、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。

GII.4 亜型の主流である Sydney_2012 は出現から約 6 年が経過しており、新たな亜型の出現が危惧されている。今回認められたキメラウイルスも NoV GII.4 の変化の一つであり、本株を含めて GII.4 亜型の変化や動向を注意深く監視していく必要がある。また、2016-2017 シーズンに大きく流行した GII.2 株のように、今後は新しい GII.4 亜型に加えて他の遺伝子型についても早期に探知することが NoV 感染症の流行予測や予防対策に重要であると考えられた。継続した流行の監視と遺伝子型別による解析が必要である。

今回の調査においては、3 ロットから NoV が検出された。しかし、ウイルス量は微量であり、3 シーズンのカキ関連事例の

発生数は 2 事例と少なく、カキのウイルス汚染状況とカキ関連事例発生が関連していることが示唆された。生カキの NoV 陽性率や汚染ウイルス量がカキ関連 NoV 食中毒発生の危険度を表す指標の一つになる可能性がある。NoV 以外に SV が検出されたことから、カキ喫食による食中毒の原因ウイルスとして NoV だけでなく SV も考慮する必要がある。HAV および HEV は検出されなかったが、HAV はカキからの検出やカキ喫食による食中毒も報告されており、市販生カキ中の汚染監視は重要である。HEV については、カキにおける汚染実態が明らかにされておらず、今後の継続した調査が必要である。

(入谷研究協力報告)

② カキからのノロウイルス検出および検出法の検討、ならびにノロウイルス GII の ORF2 全長遺伝子解析手法に関する検討

GII.17 では潜在的な軽症者や不顕性感染者の存在が推測された。

2 枚貝中の阻害物質が検出感度に大きな影響を及ぼすことが示唆された。

カキからの NoV 検出の改良法としてのアセトン添加法の検討、PEG 沈殿法によるアミラーゼ溶液の至適添加量の検討を行い、それぞれ検出率の向上に寄与できる条件を決定した。

RNA 抽出工程、RT 反応系、PCR 系の検討・改良により、検出数の多い NoV GII の 6 遺伝子型の ORF2 全長遺伝子を PCR で網羅的に増幅し、遺伝子解析可能な手法を確立した。食中毒等の発生時に、詳細な分子疫学的解析が必要となった場合に、有効に活用できると考えられる。

(山本研究協力報告)

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

4 事例で延べ 6 つの遺伝子型で塩基の置換が確認され、これらのうち 4 つが 1 塩基の置換であったことから、今回解析対象とした capsid 領域においては、同一事例集団であれば感染経路上で 1 塩基程度の置換は起こり得るとということが示唆された。

(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

感染しても病原性が低い、あるいは無症状の感染者の存在が示唆された。また、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)

⑥ 二枚貝のノロウイルス検出状況

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）が発生していた可能性があり、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推察される。

(清水研究協力報告)

⑦ 二枚貝および下水からのノロウイルスの検出と胃腸炎患者からのノロウイルスの検出状況

カキ等二枚貝および下水からの NoV の検出は、市中の流行状況と関連するものと考えられた。

(斎藤研究協力報告)

⑧ 流入下水における食品媒介性ウイルスの挙動

2016 年 7 月から 2019 年 1 月にかけて流入下水を対象に 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 遺伝子はほぼ通年検出され、特に NoVG II 群遺伝子コピー数は感染症発生動向調査で胃腸炎流行が確認される前に、遺伝子コピー数の増加が認められた。加えて、SaV も NoV と同様に通年検出され、2017 年以降は NoV よりも高コピー数で検出された。本研究より流入下水中の 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も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。また、HAV および HEV 遺伝子が流入下水から検出された時期の前後には県内において患者の発生が確認された。本研究においては、これらの疫学的な関連性を解明するには至らなかったが、環境中の病原微生物を継続的に監視することは、地域における感染症の顕在的または潜在的な流行の探知や疫

学的な関連の解明に有用であると考えられる。

(植木研究協力報告)

⑨ ノロウイルスふき取り調査及び下水サンプルを用いた腸管感染ウイルスの流行解析

模擬サンプルを用いたふき取り検査の NoV 遺伝子検出期間に関する検討では、汚染後 1 ヶ月以上検出されることが考えられた。

下水中の NoV 遺伝子量が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不顕性感染等の存在が示唆された。

下水から A 型肝炎ウイルスが検出された地域には、同時期に A 型肝炎の届出はなかったが、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。

(三好研究協力報告)

⑩ 流入水中ノロウイルスの定量および市販ノロウイルス検出キットの反応性評価

感染性胃腸炎の報告数と流入水中の NoV 量には関連があり、流入水調査をすることで県内の NoV 流行状況を把握することができることが示唆された。

GII.2 と GII.6 の遺伝子型は検出キットにより検出感度が十分ではないことが示唆された。流行するノロウイルスの遺伝子型が変化した場合、迅速に市販 NoV 検出キットの評価を行い、問題がある場合には速やかに医療機関や食品事業者等に対し情報提供を行うことが重要である。

(小林研究協力報告)

⑪ メタゲノム解析による下水からのノロウイルス・サポウイルスの検出

メタゲノム解析では、常法では検出されなかった遺伝子群及び遺伝子型の配列も検出され、下水検体に含まれる複数種類のノロウイルスやサポウイルスを幅広く検出するには有用であると考えられた。一方、ノロウイルス GI で、常法よりも検出率が低い場合があり、その原因として、GI のウイルス量が少ない可能性が考えられた。特異的プライマーを用いたダイレクトシーケンス法や、NGS を用いたディープシーケンス法の併用も考慮する必要があると考えられた。

(滝澤研究分担報告)

⑫ 集団発生例での遺伝子型の解析

本事例においては、遺伝子解析による相同性の確認が解決の一助となったと考えられた。

(宗村研究協力報告)

2. 調理従事者からの二次汚染防止に関する研究

(1) 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

墨汁の汚染除去実験で、PEG と CMC は墨汁塗布前にコーティングしておくことで、水洗いで簡易に墨汁を除去できることがわかった。また、濃度として、PEG であれば 85%エタノールに 7%溶液として、CMC は 45%エタノールに 3%溶液として使用すると良いことがわかった。この濃度設定で、コーティングした指にノロウイルスを含む糞便上清を塗布した場合、指を汚染し残存するノロウイルスを洗浄によつ

て簡易に低減することができた。

また、実際の手洗いを想定した MS2 フェージを使用して、CMC によるコーティングの評価を行ったところ、ハンドソープを用いた手洗いと同等のウイルス低減効果があった。コーティング法とハンドソープの併用でより高いウイルス洗浄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れば、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。

また、エタノール手指消毒薬と同様な感覚で使用でき、厳密な手洗いに比べて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。

(田村研究協力報告)

(2) 抗ノロウイルス活性のある化合物の探索

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

各種の消毒剤に対する不活化効果はウイルスにより、また株により異なることから、これらの結果を踏まえ、ガイドラインに示すウイルスや株の選定を行った。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選定およびその方法について検討し、今回 3 種類のウイルス(ネコカリシウイルス F9 株、ネコカリシウイルス ym3 株およびコクサッキー A6 型ウイルス)をその候補として絞り込んだ。

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ないと判断した。

(高木研究分担報告)

コクサッキー B5 型ウイルスはエタノールに対し高感受性であったことから、エタノール系消毒剤の評価のためのノロウイルスの代替ウイルスとしては不適切であると考えられた。

(上間研究分担報告)

(4) 加熱調理によるウイルスの不活化

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

CB5 について、60℃30 分、55℃60 分以上の湯煎で、3log 以上の不活化が確認できたが、50℃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℃5 分、65℃15 分の加熱により 75℃1 分と同等の、3log 以上の不活化が確認できた。

(上間研究分担報告)

(5) ノロウイルスの不活化に関する研究

各種の電解水とファインバブル水についてネコカリシウイルスとマウスノロウイルスを用いて不活化効果を比較したところ、ネコカリシウイルスでは、微酸

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

市販のペットシートに温水を含ませた場合、卓上、床であればウイルスの不活化は期待できるが、カーペットでは十分な効果は期待できない結果であった。ペットシート中心部と比較して、端では高温の持続は難しく、汚染範囲が広い場合にはペットシートの敷き方に注意が必要である。

(上間研究分担報告)

(6) 食品等の汚染ウイルス量の推定

この約 10^9 /g という量は、NoV 患者の一般的な便中のウイルス量と考えられ、今回汚染の原因となったと推定される作業者の便中のウイルス量が特段多かったわけではないと考えられた。

(上間研究分担報告)

(7) 手洗いの実施状況の検証

ATP の値を手洗いの指標として用いることが可能であることが示唆された。各種手洗い洗剤の比較により、ATP 値と使用感の傾向は概ね一致した。今後も継続的に調査を実施する必要があるものの、手洗いの検証を ATP 値を指標に継続することにより、手洗いの改善傾向が認められた。今回の結果は、一事業所での事例で

あるが、手洗いに関しては何らかの形で検証することが重要であると考えられる。

(上間研究分担報告)

(8) ノロウイルス感染における臨床症状の把握

健康チェックを行っている食品関係事業者の多くは下痢や嘔吐、発熱を聞き取り項目としており、このチェックでは軽症感染を含む非典型的な症状の感染例を捉えることは困難であり、それらの症状を呈した例では、ノロウイルス感染がみ落とされるとともに、「不顕性感染者」として捉えられる可能性が考えられた。共通性の高い症状を把握できる健康チェック票を使用することにより、軽症感染を含む非典型的な症状を呈した場合でもノロウイルス感染を疑うことができ、感染者の発見がより容易になり、食中毒防止に寄与できるものと考えられた。

(野田研究分担報告)

(9) ノロウイルスの排便後の拡散の実証実験

食品取り扱い施設内においてトイレを使用する場合には、作業着の脱衣、靴の履き替え、手洗いの励行だけでは十分とは言えないと考えられた。致し方なく、下痢時に食品取り扱い施設内のトイレを使用する時は、可能な限り汚染防止に注意を払い排便し、用後は、最大限に念入りな手洗いを心がけるとともに施設の責任者に報告し、汚染防止対策を徹底することが肝要である。一方、トイレ使用時の手袋の着用は二次汚染防止策のひとつとして有用と考えられた。

(野田研究分担報告)

E. 結論

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

ノロウイルス検査の外部精度管理調査を行うことを目的として、各検査機関の現状と検査精度について、種々の検体を用いて検討した。そこで、平成 29、30 年度はノロウイルス 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実施した。その結果、標準 DNA 溶液では実測値において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、変動係数は平成 29 年度よりもやや高くなり、ウイルス懸濁液と比較しても約 4 倍であった。しかし、これは検体の問題と測定の実施者が異なることがわかり、この 2 年間の結果はほぼ同等と考えられた。今後の展開として、参加機関を増やして、評価を行い、食品検体の基材の検討が必要となると考えられた。

(渡辺研究分担報告)

(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・トラップ法の実用面における課題への対応

パンソルビン・トラップ法の捕捉抗体として用いられているガンマグロブリンが、これまで流行したことの無い型である 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。

(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及びウイルスモニタリングに関する研究

ふき取り検体からノロウイルスを検出する際には、再浮遊液の量を減らし、更に核酸抽出に用いる試料を増すことでハイドロキシアパタイト (HAP) 等による濃縮行程が省略でき、更に検出感度も向上することを確認した。

また、ふき取り液には食品添加物指定の界面活性剤も添加可能であった。

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、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、100cm² あたり 10³ コピーオーダー程度であると推察された。

感染性胃腸炎流行期の公共施設トイレは、高率にノロウイルスに汚染されており、感染リスクがあることが実証された。特に便座裏の汚染が目立って確認されたことから、この部位の重点的清掃や汚染を軽減する対策を講じる必要がある。

(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

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。

(宗村研究協力報告)

④ カキからのノロウイルス検出のためのnestedリアルタイムPCR法の改良

リアルタイムPCRに用いるプローブをRING1-TP-(a)、TP-(b)からRING-TP-nに変更することで定量値が増加した。そのためRING-TP-nは従来のプローブより高感度にノロウイルスを検出することができると考えられる。またRING-TP-nを用いるとPCの定量値が低下したがRING1-TP-(a)の割合を低く設定したプローブmixを用いることでPCの定量値の低下を軽減することが出来た。しかしプローブmixを用いることでカキ検体自体の定量値がRING-TP-nのみを用いた時よりも低下する。そのためプ

ローブの割合についてはさらに検討する必要がある。

(上間研究分担報告)

(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

特定の細胞/コール酸の培養系でヒトサポウイルスにおいて培養上清中にウイルスRNAシグナルの増加およびコピー数の経時的増加を認めた。分離の成否に接種材料の調整法が関与している可能性が示唆された。

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。

(高木研究分担報告)

3種類の腸管系細胞株について、胆汁成分などの至適添加量を決定した。

(上間研究分担報告)

(4) 食中毒事例、胃腸炎事例、下水および食品等二枚貝からの食品媒介ウイルスの検出と遺伝子解析

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、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

NoV食中毒の感染経路など原因究明において、施設フキトリや調理従事者由来NoVの遺伝子解析は非常に有用であった。

最近 2 シーズンは NoV 流行が低調で推移しているが、新しいキメラウイルスの出現も確認されており、NoV 流行の監視と遺伝子型別による解析は必要である。

国産市販生食用カキには NoV および SV の汚染が認められ、食中毒の感染源として注意する必要がある。

今回の調査から国産市販生カキに HAV および HEV の汚染は認められなかったが、HAV はカキ喫食に伴う食中毒の原因ウイルスとして重要と考えられ、継続した監視が必要である。

(入谷研究協力報告)

② カキからのノロウイルス検出および検出法の検討、ならびにノロウイルスGIIのORF2全長遺伝子解析手法に関する検討

3 年間の研究期間において、カキおよびヒトから検出される NoV 遺伝子型の比較、カキからの NoV 検出の改良、NoV の詳細な分子疫学的解析手法の確立等に取り組んだ。

ただし、カキからの NoV 検出感度は依然として不十分であり、今後更なる検出法の改良が必要である。

(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

2012/13～2017/18 シーズンに発生した食中毒事例のうち、調理従事者から NoV が検出された事例は 15 事例であった。

4 事例 (事例番号 2, 8, 12 及び 15) において、同一事例で検出された調理従事者由来株と発症者等由来株で 1～7 塩基の相違が認められた。

1 塩基異なる場合が複数例認められたことから、capsid 領域では感染経路上で 1 塩基程度の置換は発生することが示唆

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

NoV 検出用プライマー内配列が事例内の他の検体と一致していた検体の多くは、RdRp-VP1 全長の比較でも「一致」または「ほぼ一致 (1 塩基違い)」した。また、事例としてみた場合も、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、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。

(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。

(高橋研究協力報告)

⑥ 二枚貝のノロウイルス検出状況

市内で流通する生食用生カキの 25.0% から遺伝子型別不能の GI が検出された。

市内で流通するシジミの NoV 保有率(陽

性率)は4.2%と比較的低かったものの、生食又は加熱不十分な状態で喫食することによって NoV に感染する可能性があるため、注意が必要である。

市内河川に生息するシジミの NoV 保有率(陽性率)は32.7%であった。

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、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。

(清水研究協力報告)

⑦ 二枚貝および下水からのノロウイルスの検出と胃腸炎患者からのノロウイルスの検出状況

カキ等二枚貝および下水からの NoV の検出は、市中の流行状況と関連するものと考えられた。

(斎藤研究協力報告)

⑧ 流入下水における食品媒介性ウイルスの挙動

流入下水中の病原微生物を継続的に監視することは、地域における感染症の顕在的または潜在的な流行の探知に有用であると考えられた。

(植木研究協力報告)

⑨ ノロウイルスふき取り調査及び下水サンプルを用いた腸管感染ウイルスの流行解析

調理施設のトイレ等を対象としたふき取り調査を実施したが、NoV は検出されなかった。ふき取り検査での NoV 遺伝子の検出可能な期間に関する検討では、1ヶ月後のサンプルでも遺伝子が検出された。

下水サンプルから 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、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。

(三好研究協力報告)

⑩ 流入水中ノロウイルスの定量および市販ノロウイルス検出キットの反応性評価

県内の感染性胃腸炎報告数と終末処理場流入水からの NoV 量には関連が認められ、流入水調査の結果は NoV の流行を反映していた。

GII.4, GII.17 は全てのキットで検出可能であった。しかし、GII.2 および GII.6 に対して検出できないキットがあることが示唆された。

(小林研究協力報告)

⑪ メタゲノム解析による下水からのノロウイルス・サポウイルスの検出

メタゲノム解析を下水からのウイルス検出に適応した結果、ノロウイルスやサポウイルスを幅広く検出することができた。

(滝澤研究分担報告)

⑫ 集団発生例での遺伝子型の解析

2016/17シーズンにおいて、東京都でのNoVの検出はシーズン当初の11月から急激に増加し12月に検出がピークとなった。最も多く検出されたNoVの遺伝子型はGII.2であった(65.7%)。これに対し、GII.17は検出例が減少した(11.9%)。遺伝子型の把握は長期的な疫学解析において有用であるばかりでなく、食中毒事例間の関連性や原因食品を究明する上でも重要な情報であると考えられた。

(宗村研究協力報告)

2. 調理従事者からの二次汚染防止に関する研究

(1) 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

水溶性ポリマーによる手指のコーティング法は、水洗いで簡易にウイルス汚染を除去することができ、ハンドソープを用いた手洗いと同等のウイルス汚染除去効果があった。

(田村研究協力報告)

(2) 抗ノロウイルス活性のある化合物の探索

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。そのうちの化合物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。

(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

各種の消毒剤に対する不活化効果はウ

イルスにより、また株により異なることから、これらの結果を踏まえ、ガイドラインに示すウイルスや株の選定を行った。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選定およびその方法について検討し、今回3種類のウイルス(ネコカリシウイルスF9株、ネコカリシウイルスym3株およびコクサッキーA6型ウイルス)をその候補として決定した。

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。

(高木研究分担報告)

コクサッキーB5型ウイルスはエタノールに対し高感受性であり、エタノール系消毒剤の評価ではノロウイルスの代替ウイルスとしては不適切であることが示された。

(上間研究分担報告)

(4) 加熱調理によるウイルスの不活化

低温加熱によるノロウイルスの遺伝子定量値はネコカリシやコクサッキーウイルスB5型と概ね類似した動きを示したことから、ノロウイルスもそれらと概ね同様の条件で不活化される可能性が示された。

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°C

5分、65°C15分の加熱で3log以上の不活化が確認できた。

(上間研究分担報告)

(5) ノロウイルスの不活化に関する研究

各種の電解水やファインバブルについてネコカリシウイルスとマウスノロウイルスに対する不活化効果を検討した結果、弱酸性電解水の不活化効果が高い傾向が認められた。

ペットシートに温水を含ませる加熱方法は、床や卓上では、ウイルスの不活化が期待できる温度保持ができたが、カーペットでは困難であった。また、ペットシートの、中心部と端部について比較すると、中心部の温度保持が高い傾向にあった。

(上間研究分担報告)

(6) 食品等の汚染ウイルス量の推定

2017年1月から2月に発生した刻み海苔関連ノロウイルス食中毒事件において摂取されたウイルス量および汚染源となった感染者の糞便中のウイルス量の推定を行った。御坊市での事例では一人が6,250コピーのNoVを摂取したと考えられた。汚染が約800人程度と仮定すると、全体として 5×10^6 コピーの汚染があったと推定された。海苔の刻み作業を行った感染者の便中のウイルス量は約 $10^9/g$ であったと推定された。

(上間研究分担報告)

(7) 手洗いの実施状況の検証

ATPの値を手洗いの指標として用いることが可能であることが示唆された。各種手洗い洗剤の比較により、ATP値と使用感の傾向は概ね一致した。手洗いの検証

を続けることにより、手洗いの改善傾向が認められ、検証の重要性が示唆された。

(上間研究分担報告)

(8) ノロウイルス感染における臨床症状の把握

健康管理において、ノロウイルス感染に比較的共通に認められる症状である胃部の異常、便性状の変化、倦怠感などを把握することがノロウイルス感染者の把握に重要である。

(野田研究分担報告)

(9) ノロウイルスの排便後の拡散の実証実験

ノロウイルスに感染した従事者がトイレで排便した場合、作業着の汚染を介して食品取扱室にウイルスを持ち込む可能性が示唆された。手袋を着用してのトイレの利用は、作業着等への汚染防止の手段として有用であった。

(野田研究分担報告)

F. 健康危害情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Hiroyuki Saito, Miho Toho, Tomoyuki Tanaka and Mamoru Noda: Development of a practical method to detect noroviruses contamination in composite meals. *World Biomedical Frontiers*, <http://biomedfrontiers.org/inf-2016-3-5/> (2016).

2) Hiroko Sato, Chihiro Shibata, Wakako Akino, Hiroyuki Saito, Shihoko

- Saito, Naota Monma, Akira Toukairin, Mamoru Takahashi, Hiromi Fujita, Teruki Kadosaka, Nobuhiro Takada, Hiroki Kawabata and Shuji Ando: Survey of *Leptotrombidium akamushi* in Omono river basin in Akita Prefecture, Japan in 2011~2014. *Med. Entomol. Zool.*, **67** (3), 167-175 (2016).
- 3) Hiroyuki Saito, Miho Toho, Tomoyuki Tanaka and Mamoru Noda: "PANtrap": A Novel Detection Method for General Food Samples. In Paul K. S. Chan, Hoi ShanKwan and Martin C. W. Chan (Eds.) *THE NOROVIRUS*. New York: Academic Press, pp145-153 (2016).
- 4) Hiroko Sato, Chihiro Shibata, Yoko Fujiya, Wakako Akino and Saito H: Epidemiology of scrub typhus in Akita Prefecture, 2007-2016. *Infectious Agents Surveillance Report*, **38** (6), 5-6 (2017).
- 5) Hiroyuki Saito, Wakako Akino, Hiroko Sato, Yoko Fujiya, Chihiro Shibata, Ryoetsu Sato and Hiroyuki Shimizu: Isolation of enterovirus D68 using suckling mice. *Infectious Agents Surveillance Report*, **38** (10), 11-12 (2017).
- 6) 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).
- 7) 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).
- 8) 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).
- 9) 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).
- 10) 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).
- 11) 宗村佳子: 東京都におけるノロウイルス検出状況 (2015). 食品衛生学雑誌, 57(6):194-96(2016)
- 12) 宗村佳子, 木本佳那, 小田真悠子, 奥津雄太, 秋場哲哉, 貞升健志: IASR 東京都におけるノロウイルス GII.17 流行の分子疫学. 38(1):5-6(2017)
- 13) 宗村 佳子, 木本 佳那, 小田 真

悠子, 永野 美由紀, 奥津 雄太, 森 功次, 秋場 哲哉, 貞升 健志: 拭き取り検体からのノロウイルス遺伝子検出状況. 食品衛生学雑誌, 58(4), 201-204(2017)

14) 宗村 佳子, 木本 佳那, 小田 真悠子, 奥津 雄太, 加藤 玲, 鈴木 康規, 齊木 大, 平井 昭彦, 秋場 哲哉, 新開 敬行, 貞升 健志: 学校給食で提供された刻みのりによるノロウイルス食中毒. 食品衛生学雑誌, 58(6), 260-267(2017)

15) Somura Y, Mizukoshi F, Nagasawa K, Kimoto K, Oda M, Shinkai T, Murakami K, Sadamasu K, Katayama K, and Kimura H. A food poisoning outbreak due to food handler-associated contamination with the human norovirus GII.P16-GII.2 variant strain in Italian cuisine in Tokyo during the 2016/17 winter season. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 71, 172-173 (2018)

16) 入谷展弘, 上林大起, 改田 厚, 阿部仁一郎, 中村寛海, 山元誠司, 久保英幸, 小笠原 準, 伯井紀隆, 森 宏美, 坂本徳裕, 廣川秀徹, 松本健二, 吉村高尚, 土見日出夫, 喜多直哉, 伊藤大樹, 野田 衛: 集団胃腸炎事例からのノロウイルス GII.P16-GII.4 Sydney_2012 の検出—大阪市, 病原微生物検出情報 月報 37(No. 437), 18-20 (2016)

17) 山元誠司, 上林大起, 改田 厚, 久保英幸, 入谷展弘, 小笠原 準, 伯井紀隆, 森 宏美, 藤森良子, 廣川秀徹, 松本健二, 吉村高尚: G2 型の A 群ロタウイルスによる感染性胃腸炎集団事例, 2016 年—大阪市, 病原微生物検出情報 月報 37(No. 437), 21-22 (2016)

18) 入谷展弘, 改田 厚, 山元誠司, 上林大起, 阿部仁一郎, 久保英幸, 野田 衛, 西尾孝之, 小笠原 準: 市販生カキにおけるウイルス汚染調査 (2010-2011~2015-2016 シーズン), 大阪市立環境科学研究所報告 調査・研究年報 78, 1-6 (2016)

19) 入谷展弘, 上林大起, 改田 厚, 阿部仁一郎, 山元誠司, 久保英幸, 平井有紀, 野田 衛, 小笠原 準: 2016-2017 シーズンに大阪で認められたノロウイルス流行, 大阪市立環境科学研究所報告 調査・研究年報 79, 1-4 (2017)

20) 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)

21) 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)

22) 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)

23) 野田 衛 (2016) 食品中の病原ウイルスの検出法, 食品衛生学雑誌, 57, J152-J155

24) 野田 衛 (2016) 食品取扱者を介して二次汚染! ノロウイルス対策, , 718, 8-19 食中毒, 食と健康, 706, 8-18

25) 野田 衛 (2016) 二枚貝を介するノロウイルス食中毒の現状と対策, 食品衛生学雑誌, 58, 12-25

26) 上間匡, 野田衛 (2017) ノロウイルスによる食中毒, 公衆衛生, 81(6):

27) 野田衛 (2017) 改訂新版 ノロウイルス食中毒・感染症からまもる!!-その知識と対策-, 公益社団法人日本食品衛生協会, 1-156

28) 野田衛 (2017) 刻み海苔を介したノロウイルス食中毒事件が教えてくれたこと, 国立医薬品食品衛生研究所報告, 135, 6-12

29) 野田衛 (2017) 本邦初の刻み海苔を介した分散型広域ノロウイルス食中毒事件の全体像, 食品衛生研究, 67. 7-14

2. 学会発表

1) 今野貴之, 高橋志保, 熊谷優子, 斎藤博之: サルモネラの血清型別への遺伝子検査法からのアプローチ, 第27回秋

田応用生命科学研究会講演会, 2016, 秋田

2) 斎藤博之, 佐藤寛子, 早川智, 牛島廣治: ノロウイルスGII.P17-GII.17に再感染した症例における免疫応答, 第57回日本臨床ウイルス学会, 2016, 郡山

3) Hiroyuki Saito, Miho Toho, Mamoru Noda, Tomoyuki Tanaka: Noroviruses RNA detection in contaminated foods by a PANtrap method. 第11回日中国際ウイルス学会, 2016, 観音寺

4) 斎藤博之, 秋野和華子, 野田衛: ノロウイルス遺伝子型別の効率化に関する検討, 第37回日本食品微生物学会学術総会, 2016, 東京

5) 秋野和華子, 斎藤博之, 野田衛: 市販生カキからのノロウイルス・サポウイルスの検出と秋田県内における流行状況の推移, 第37回日本食品微生物学会学術総会, 2016, 東京

6) Ushijima H., Saito H., Shimizu Y., Sato H., Thongprachum A., Khamrin P., Okitsu S., Takanashi S., Maneekarn N. and Hayakawa S.: Immune response against different genotypes of noroviruses in two adults with the recurrent infection. 第6回国際カリシウイルス学会, 2016, Savannah

7) Hiroyuki Saito, Yuko Shimizu, Hiroko Sato, Wakako Akino, Satoshi Hayakawa and Hiroshi Usijima: Immunological response in a patient of norovirus GII.P17-GII.17 infection. 第64回日本ウイルス学会学術集会, 2016, 札幌

8) 斎藤博之, 秋野和華子, 野田衛:

疫学的視点から見たノロウイルス GII. P17-GII. 17 型の病原性に関する一考察, 第 112 回日本食品衛生学会学術講演会, 2016, 函館

9) 斎藤博之, 秋野和華子, 佐藤寛子, 清水優子, 早川智, 牛島廣治: ノロウイルス GII. 17 感染に伴う免疫応答と病原性に関する一考察, 秋田応用生命科学研究会第 28 回講演会, 2016, 秋田

10) 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: 生カキが原因でノロウイルスに感染した症例におけるノロウイルス排泄状況と抗体価の推移, 第 29 回秋田応用生命科学研究会講演会, 2017, 秋田

11) 斎藤博之, 佐藤寛子, 早川智, 牛島廣治: 生カキ喫食後の胃腸炎症例におけるノロウイルス排泄状況と免疫応答, 第 58 回日本臨床ウイルス学会, 2017, 長崎

12) 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: パンソルビン・トラップ法の捕捉抗体供給源としてのガンマグロブリンの再評価, 第 38 回日本食品微生物学会学術総会, 2017, 徳島

13) 秋野和華子, 斎藤博之, 野田衛: 市販生カキにおけるノロウイルス汚染の定量的調査, 第 38 回日本食品微生物学会学術総会, 2017, 徳島

14) Hiroyuki Saito, Yuko Shimizu, Hiroko Sato, Wakako Akino, Satoshi Hayakawa and Hiroshi Usijima: Immunological response in a patient of norovirus infection associated with raw oyster. 第 65 回日本ウイルス学会学

術集会, 2017, 大阪

15) 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: ノロウイルス GII. 17 に対するパンソルビン・トラップ法の有効性に関する検討, 第 113 回日本食品衛生学会学術講演会, 2017, 東京

16) 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

17) 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 20th meeting EUROPEIC, Egmond aan Zee, The Netherland (2018).

18) 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

19) 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

20) 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

21) 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

22) 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

23) 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

24) 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

25) 宗村佳子: 東京都におけるノロウイルス検出状況(2015). 第111回食品衛生学会学術講演会シンポジウム

26) 宗村佳子: ノロウイルス食中毒ー刻み海苔を原因とした大規模な即中毒事例を踏まえー. 第113回食品衛生学会学術講演会, 東京, 2017年11月10日

27) 山元誠司, 改田 厚, 上林大起, 久保英幸, 入谷展弘: 2015/16 シーズンに大阪市内で流行したロタウイルス A (G2P[4]株) の遺伝子解析, 第64回日本ウイルス学会, 札幌 (2016. 10. 23-25)

28) 上林大起, 改田 厚, 山元誠司, 久保英幸, 入谷展弘: 手足口病流行へのコクサッキーウイルス A6 の関与, 第64

回日本ウイルス学会, 札幌 (2016. 10. 23-25)

29) 入谷展弘, 上林大起, 改田 厚, 阿部仁一郎, 山元誠司, 久保英幸, 野田衛: 2016/17 シーズンに大阪市内で認められたノロウイルス GII.2 流行, 第65回日本ウイルス学会, 大阪 (2017. 10. 24-26)

30) 谷澤 由枝, 重本 直樹, 高尾信一, 野田 衛: ふき取り検体からのハイドロキシアパタイトによるノロウイルス濃縮法の検討, 第37回日本食品微生物学会学術総会, 2016, 東京

31) 谷澤 由枝, 重本 直樹, 高尾信一, 野田 衛: ふき取り検体からのノロウイルス検出法の改良及び公共施設トイレにおけるノロウイルスモニタリング, 第38回日本食品微生物学会学術総会, 2017, 徳島

32) 芦塚由紀, 吉富秀亮, 野田衛: 飲用水からノロウイルスが検出された食中毒事例, 第37回日本食品微生物学会, 東京都, 9月15日, 2016

33) 中村麻子, 吉富秀亮, 小林孝行, 芦塚由紀, 梶原淳睦, 野田衛: 市販ノロウイルス検出イムノクロマトキットの遺伝子型別反応性評価, 第64回福岡県公衆衛生学会, 福岡市, 5月18日, 2017

34) 小林孝行, 吉富秀亮, 中村麻子, 芦塚由紀, 梶原淳睦, 野田衛: 福岡県内の食中毒事例から検出されたノロウイルス GI.Pc-GI.5 の遺伝子解析, 第38回日本食品微生物学会, 徳島県, 10月5日, 2017

35) 小林孝行, 吉富秀亮, 中村麻子, 芦塚由紀, 梶原淳睦, 野田衛: 福岡県内で発生したノロウイルス GI.Pc-GI.5 に

よる食中毒事例について, 第 43 回九州衛生環境技術協議会, 北九州市, 10 月 12 日, 2017

36) 三元昌美, 上間 匡, 野田 衛 (国立医薬品食品衛生研究所) (2016)市販用カキのノロウイルス, F-ファージ, 細菌(細菌数, E. coli 最確数)の汚染状況の比較, 第 112 回日本食品衛生学会学術講演会, 函館市, 10/28

37) 三元昌美, 上間 匡, 野田 衛 (2016)プラーク法によるカキからの F-ファージ検出法の検討, 第 37 回日本食品微生物学会学術総会, 江戸川区, 9/15

38) 小菅大嗣, 三元昌美, 上間 匡, 小林直樹小西良子, 野田 衛 (2016)各種負荷剤を用いた市販塩素系消毒剤のネコカリシウイルスに対する不活化効果の比較, 第 37 回日本食品微生物学会学術総会, 江戸川区, 9/15

39) 小菅大嗣, 三元昌美, 上間匡, 小林直樹, 小西良子, 野田衛: 低温加熱試験によるノロウイルスの不活化, 第 112 回日本食品衛生学会学術講演会, 2016, 函館

40) 上間 匡, 三元昌美, 小菅大嗣, 野田 衛 (2016)感染性推定遺伝子検査法および次世代シーケンサーを用いたカキからのノロウイルス遺伝子の検出, 第 37 回日本食品微生物学会学術総会, 江戸川区, 9/15

41) 上間 匡, 三元昌美, 古山祐輔, 野田 衛 (2016)F-RNA フェージの遺伝子型別法の検討および市販用カキから検出された F-ファージの遺伝子型別, 第 112 回日本食品衛生学会学術講演会, 函館市, 10/27

42) 鈴木達也, 渡辺卓穂, 中阪聡亮, 梅津麻実, 上間匡, 野田衛, ノロウイルス検査の外部精度管理調査, 第 112 回日本食品衛生学会学術講演会, 函館, 2016

43) 永田文宏, 上間匡, 濱島洋介, 寺杣文男, 野田衛 (2017)パンソルビントラップ法による食品からのノロウイルスの検出, 第 113 回日本食品衛生学会学術講演会, 江東区, 2017

44) 上間匡, 永田文宏, 野田衛 (2017)糞便汚染指標としての Pepper mild mottle virus の評価, 第 113 回日本食品衛生学会学術講演会, 江東区, 11/9

45) 高木弘隆, 永田文宏, 上間匡, 野田衛 (2017)食品媒介性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(1)ーヒトノロウイルス代替ウイルス選定に関する検討, 第 38 回日本食品微生物学会学術総会, 徳島市, 10/5

46) 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)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

47) 高木弘隆: 今だからこ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

48) 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

49) 名古屋真弓, 板持雅恵, 稲崎倫子, 稲畑良, 佐賀由美子, 米田哲也, 野田衛, 滝澤剛則, 小淵正次 (2016)メタゲノム解

析による下水からのノロウイルス・サポ
ウイルス検索，第64回日本ウイルス学会
学術集会，札幌市，10/24

3. 業界関係者向け説明会

1) 「ウイルスによる感染症についてー
ノロウイルス胃腸炎と感染予防対策」食
品衛生講演会，2017年2月21日，天王寺
都ホテル，南東部ブロック食品衛生協会，
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14日，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）

3) 「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，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）

4. 行政関係者向け説明会

1) 「ノロウイルス食中毒調査における
遺伝子解析について」第58回近畿食品衛
生監視員研修会特別講演，2017年8月24
日，大阪市中央公会堂，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」
総合研究分担報告書(平成 28～30 年度)

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

研究分担者 高木 弘隆 国立感染症研究所
バイオセーフティ管理室

研究要旨

hNoV を中心とした食品媒介性下痢症の感染・拡大の制御における有用手段として化学的除染が期待されるが、hNoV を用いた培養系評価が困難であり、評価方法も統一されていないことから代替ウイルスでの結果も比較ができていない。これを踏まえ評価ガイドラインの策定を目指し、供試候補 non-envelope virus を用いてエタノール製剤や NaClO、酸化剤などによる不活性化効果比較を行った。製剤の有効成分濃度、組成などでウイルス間・ウイルス株間で不活性化効果に顕著な差が認められ、一部の結果のみならず、総合的な評価による実効性・使用場面の判断が必要であることが示唆された。

A. 研究目的

食品媒介あるいは介在を起因と下痢症ウイルス感染及びその拡大防止は社会的ダメージが深刻であり、より汎用的かつ実効性の高い手法が渴望されている。これには「推定されうる要因物質・汚染箇所の迅速・局所的除染」が効果的であり、その一手段として化学的除染、いわゆる化学製剤を用いた除染が挙げられ、その一端は予防にも繋がる可能性がある。しかしながら対象ウイルスの対環境耐性等の性質を鑑みると容易ではなく、使用可能な製剤はかなり限定されている。また hNoV についてはある程度培養が可能になっているが、操作性・コストの面で汎用性は低く、巷にある多くの製剤を検証

するには非常に困難である。

加えて現在これら製剤に関する評価系のガイドラインは国内に存在せず、諸外国のガイドラインを参照して、企業単位で検証結果を提示するケースが多く、データの比較も非常に困難な状況にある。

こうした状況を踏まえ、現場において実際の除染。感染制御における適切な手法選択が可能となるよう、その科学的根拠となる評価方法の適正化を図るべく、評価ガイドラインの策定を目指すこととした。今回は hNoV 代替法として、代替ウイルスの選定とその特性について検証した。

B. 研究方法

1. 供試材料

a) ウイルス

- ①FCV* F9 株(ATCC VR-782)
 - ②FCV ym3 株(臨床分離株、化学剤抵抗性)
 - ③MNV** S7-PP3 株(日大・遠矢氏供与)
 - ④Enterovirus type71(EV71); Shiga1095 株
 - ⑤human poliovirus type-sabin I(hPoV-I)
- ④⑤はウイルス二部・清水氏より供与
*feline calicivirus **murine norovirus

b) 使用培養細胞

- ①CRFK 細胞(JCRB9035)
 - ②RAW264.7 細胞(ATCC TIB-71)
 - ③VERO 細胞(ATCC CCL-81)
 - ④HEp2 細胞(ATCC CCL-23)
- ①は FCV、②は MNV、③は EV71、④は hPoV の各培養用として使用した。

c)使用培地

- ①2~5%FBS_EMEM
 - ②5%FBS_DMED(high-glucose)
- ①は CRFK、VERO、HEp2 用、②は RAW 用

2. 方法 1) エタノール製剤による供試ウイルス不活性化の比較検討

自家調整エタノールは終濃度が 50~80%となるよう Et 溶液を調製する。市販局方消毒用エタノール(消毒用エタノール IP ; 健栄製薬)は原液のまま使用した。エタノール(Et)溶液と供試ウイルスの混合比を 9:1 とし、マイクロチューブ内にて混合した。反応後 15~最長 300 秒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する。96well-microplate にて 7 倍段階希釈系(7^{-1} ~ 7^{-8})を作成し、これ

を予め用意した培養細胞 96well-micro-plate に $50 \mu\text{l/well}$ で接種した。 $36^\circ\text{C} \cdot 5\%\text{CO}_2$ にて 4~6 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) 次亜塩素酸ナトリウム液による供試ウイルス不活性化の比較検討
有効塩素 5%以上の次亜塩素酸ナトリウム液より、有効塩素 200ppm(0.02%)±を滅菌精製水にて希釈調製した(試験用 NaClO)。試験用 NaClO と供試ウイルスの混合比を 9:1 として、マイクロチューブ内にて混合した。反応後 20~180 秒まで経時的に採取し、ただちに中和用培地液 1*にて 7 倍希釈し反応を停止する。

96well-microplate にて 7 倍段階希釈系(7^{-1} ~ 7^{-8})を作成し、これを予め用意した培養細胞 96well-microplate に $50 \mu\text{l/well}$ で接種した。 $36^\circ\text{C} \cdot 5\%\text{CO}_2$ にて 4~6 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 3) 炭酸ナトリウム、過酸化水素及び過炭酸ナトリウムの各溶液による FCV 及び MNV 不活性化の比較検討

炭酸ナトリウム(Na_2CO_3)、過酸化水素水(H_2O_2)、及び過炭酸ナトリウム($\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}_2$)は各々強アルカリ(pH11 以上)、酸化剤、強アルカリ+酸化、という性質を持ち、この 3 者を調べることにより、個々の感受性と両者の相乗効果を図ることが出来る。代替ウイルスの代表格である FCV・

MNV の性状を確認する上で重要なファクターとなり得る。

炭酸ナトリウム及び過炭酸ナトリウムについては各 1% 溶液を、過酸化水素水については 30% 原液を希釈し、0.25~2% 液を調製した。各試験液と供試ウイルスの混合比を 4:1 とし、マイクロチューブ内にて混合した。炭酸ナトリウム及び過炭酸ナトリウムは反応後 2~15 分まで、過酸化水素水反応後 5~60 分まで経時的に採取し、ただちに中和用培地液 2**にて 7 倍希釈し反応を停止する。

96well-microplate にて 7 倍段階希釈系 (7^{-1} ~ 7^{-8}) を作成し、これを予め用意した培養細胞 96well-microplate に $50 \mu\text{l/well}$ で接種した。36°C・5%CO₂にて 4~6 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。

*中和用培地液 1 :

20mM Na₂S₂O₃ 含有各使用培地

**中和用培地液 2 :

・H₂O₂ 用 : 20 $\mu\text{g/ml}$ Catalase 含有各使用培地

・炭酸 Na 用 : 重炭酸 Na 不含、10mM HEPES 含有各使用培地

・過炭酸 Na 用 : 20 $\mu\text{g/ml}$ Catalase、10mM HEPES 含有、重炭酸 Na 不含各使用培地

(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. 結果 1 エタノール製剤による各ウイルスの不活性化

FCV においては 60-70% v/v で感染価減衰が最大となり反応時間 60-120 秒以降で顕著な減衰が認められた。これに対し局方濃度 80% v/v 土では感染価減衰が非常に弱くなる傾向もみられた(図 1-a)、1-b))。MNV は 50~80% v/v まで速やかな感染価減衰を示す。EV71 では局方濃度 80% v/v においても 3 分まで感染価減衰はほとんど認められず(図 2)、hPoV-I では同様の濃度で反応時間 60 秒以降に顕著な感染価減衰が認められた(図 3)。

2. 結果 2 NaClO 200±10ppm による各ウイルスの不活性化

FCV、MNV、EV71、hPoV-I はいずれも反応 20-40 秒後に検出限界となり、4~5log₁₀TCID₅₀ の感染価減衰となった(表 1)。

3. 結果 3 H₂O₂、Na₂CO₃、及び Na₂CO₃・H₂O₂ による FCV、MNV の不活性化

まず H₂O₂ について、FCV-F9 と MNV-S7 の不活性化効果を比較したところ、FCV-F9 で 2%、MNV-S7 で 0.5% の感染価減衰の傾きがほぼ一致した。すなわち FCV に比べ、MNV のほうが H₂O₂ に対する感受性が約 4 倍高かった。また 2% 濃度では約 20 分で 4log₁₀TCID₅₀ の感染価減衰がみられた(図 4-a)、4-b))。

次に Na₂CO₃ 及び Na₂CO₃・H₂O₂ について、FCV では反応 2 分後で速やかな感染価減衰がみられ、反応後 5-7 分には 5log₁₀TCID₅₀ まで感染価が減衰した(図 5-a))。MNV では Na₂CO₃ で反応 15 分後でも 1log₁₀TCID₅₀ 程度の感染価減衰にとど

まったが、 $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}_2$ においては反応後10分で検出限界以下となり、 $4\log_{10}\text{TCID}_{50}$ の感染価減衰が認められた(図5-b))。この際1% $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}_2$ 中の過酸化水素濃度は0.16-0.18%で、5時間までは安定であった。

D. 考察

エタノール製剤については calicivirus と enterovirus で、その感受性濃度がかなり異なることが明らかになり、enterovirus 同士でも hPoV-I と EV71 では感染価減衰の有無に至る相違が認められた。hPoV-I の感染価減衰パターンは EtOH50-60%における FCV-F9 と酷似するものでもあった。hPoV-sabin III も 80%エタノール製剤で同時に検証したところ、感受性が高く反応 60 秒後には検出限界に至るほどであった(図3)。また non-envelope virus 対応のエタノール製剤について、いくつかピックアップ検証を行ったが、EV71 に対する不活性化効果は様々であり、感染価減衰はするが、実効性に関して極端に良いとは言いがたかった(図6)。加えて雑品として販売されている除菌用エタノール剤(EtOH-compA; pH3.7, 62.5%v/v)はFCV に対しては速効性を示した(図7-a)ものの、EV71 や hPoV-I に対して不活性化効果は全くなかった(図7-b、7-c))。おそらくFCV に対しては含有成分である有機酸が主に作用しているものと考えられ、さきの結果と合わせて、酸性条件下でのエタノール製剤のウイルス不活性化効果は成分依存的に限定されると考える。

次に NaClO について、NaClO 200ppm による除染処理はノロウイルス対策 Q&A にも推奨されており、calicivirus はもちろ

ん、今回供試した enterovirus にたいしても即時的な不活性化を示した。更に NaClO100ppm で行った FCV-ym3 と EV71 の不活性化試験では FCV-ym3 で顕著な virion 残存が認められるが、EV71 では反応 20 秒以降、ほとんど検出できなくなっている(表2)。よって「non-envelope virus が全て塩素系に強い」のではないことが明確に示された。FCV-ym3 の塩素抵抗性は「次亜塩素酸水(ほとんどが電解水)」などでも確かめられており、今後塩素系製剤評価をカバーする上で、やはり『感受性差』は留意が必須である。Enterovirus の中では human parechovirus が NaClO に対して抵抗性を示す傾向があるため、評価用ウイルスとしての採用も含め、目下検証中である。またエタノール製剤と NaClO の不活性化効果の結果より、hPoV は他の enterovirus でも十分に代替が可能であり、流行状況や WHO 推進の GAP3 を鑑みても、評価用として継続使用することは適切でないと考える。

最後に H_2O_2 、 Na_2CO_3 、及び $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}_2$ についてだが、これらは日常雑品の成分として汎用されているが、ウイルスに対する不活性化効果の報告例は極端に少ない。現在では単品入手も容易であり、NaClO と比較しても物的に安定であるため、今後の検証結果によっては使用場面が増える可能性がある。しかしながら、雑品ゆえに効能・効果は示せないということもあり、得られた結果をどのように示してゆくに課題を残すところである。Na₂CO₃ 単体では同じ calicivirus でも FCV と MNV で感受性が極端に異なること、envelope-virus である influenza virus に対し

ても不活性化効果が極端に低い(data not shown)こともあり、単独での使用はかなり限定されるであろう。Na₂CO₃・H₂O₂ においては相乗的な不活性化効果が MNV で認められており、他の non-envelopoe virus についても同様の効果を期待し、現在検証を進めている。

以上の検証より、化学製剤に対する感受性はウイルスにより、また株により様々であり、もちろん hNoV も同じ土俵に上がることを踏まえても、各種ウイルスを用いた総合的な評価が望まれることは必定である。

E. 結論

今回「ウイルス不活性化評価ガイドライン」策定の検証において、基本的な製剤であるエタノール、NaClO に対し、供

試ウイルス間・ウイルス株間で不活性化効果に明らかな差が生じることが示された。また H₂O₂、炭酸 Na 及び過炭酸 Na に対しては calicivirus 内で不活性化効果に顕著な差が認められた。hNoV の対化学製剤感受性が不明確である以上、これらを駆使して、総合的な判断が可能となるよう当該ガイドライン策定を目指す。

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.

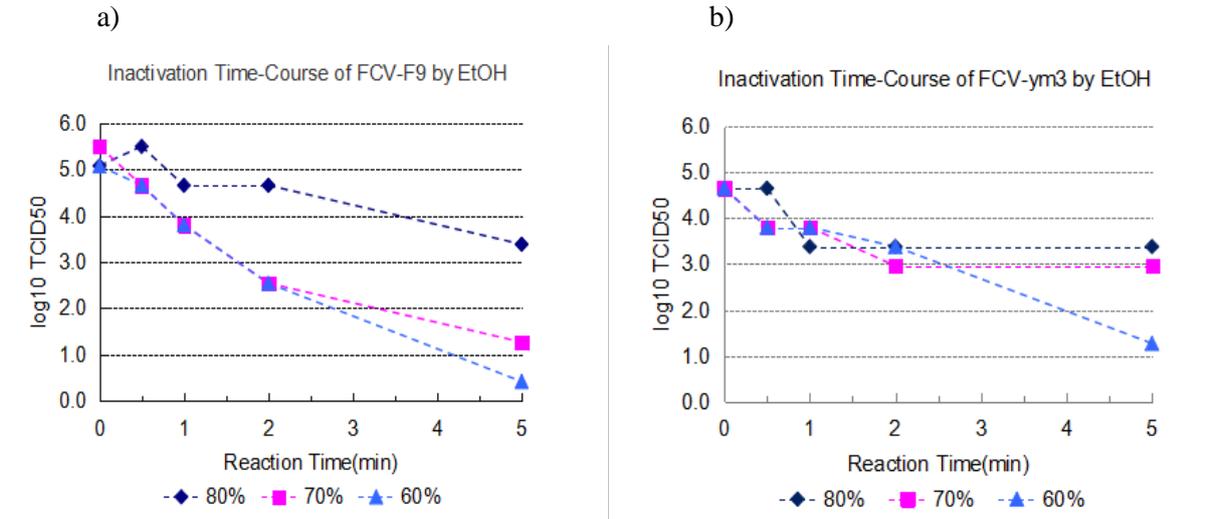


図 2. 局方消毒用エタノール IP(EtOH-IP)による EV71 不活性化効果

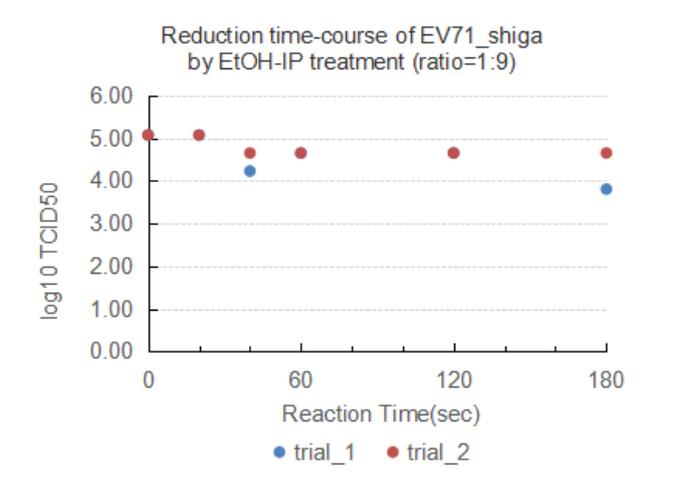


図 3. 局方消毒用エタノール IP(EtOH-IP)による hPoVs 不活性化効果

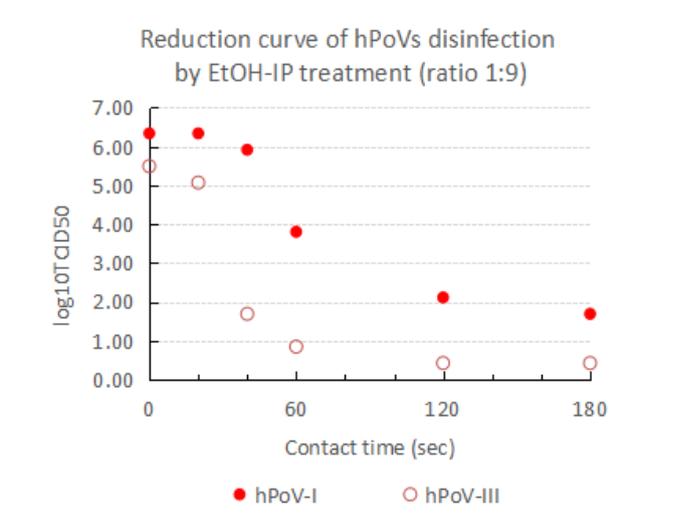


図4. H₂O₂ 溶液による FCV 及び MNV の不活性化効果

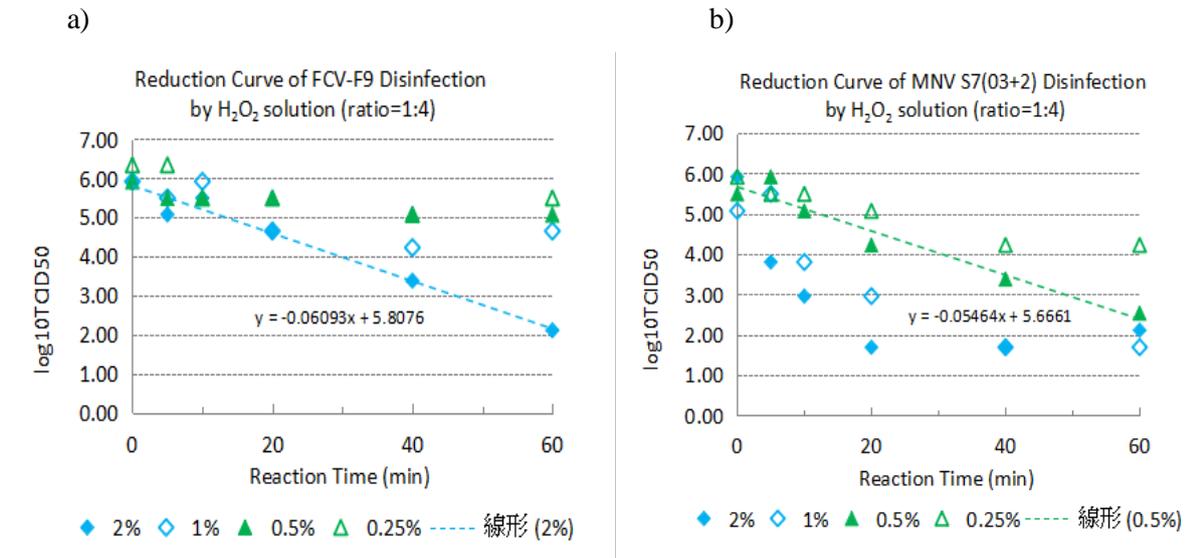


図5. Na₂CO₃ 及び Na₂CO₃·H₂O₂(perCO₃Na₂)による FCV 及び MNV の不活性化効果

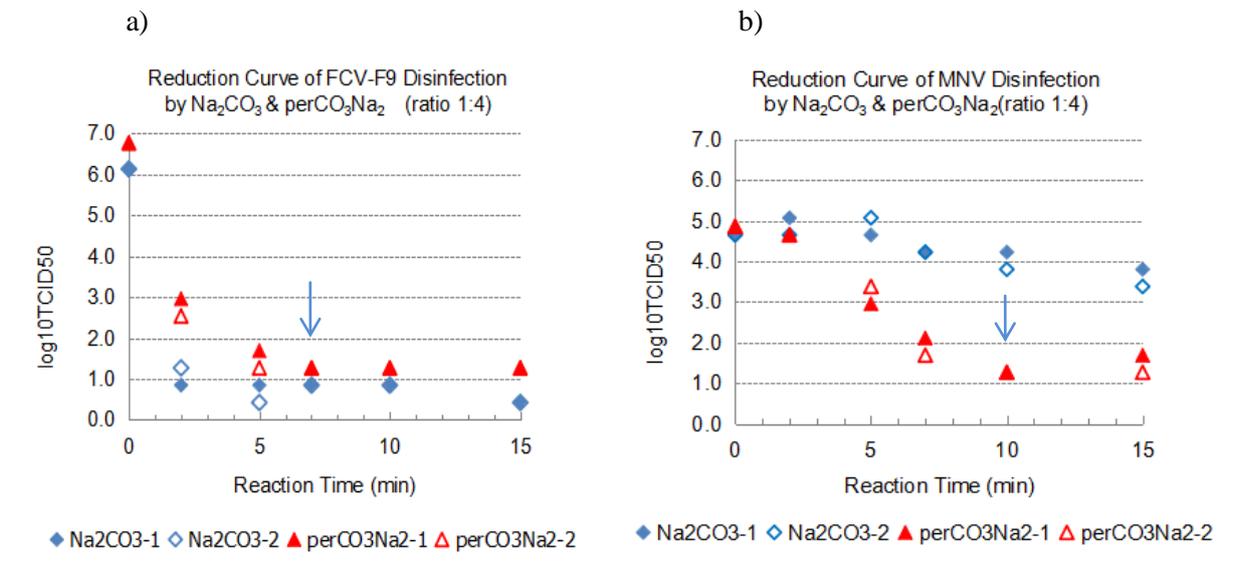


図6. 各種エタノール製剤(non-envelope virus 対応品)による EV71 の不活性化効果

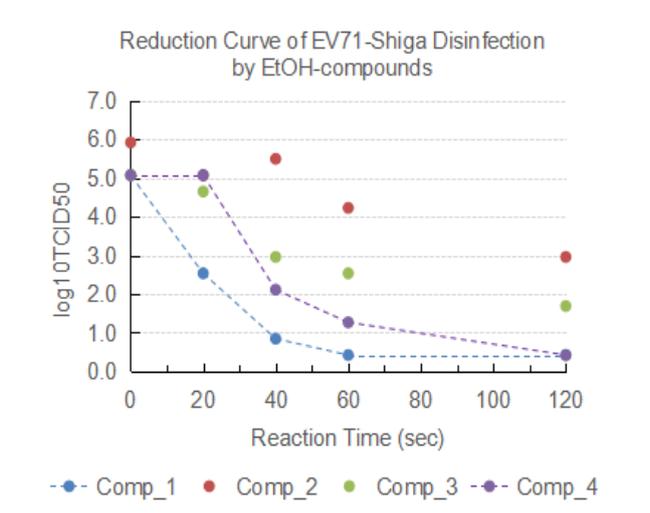


図 7. 除菌用エタノール製剤(雑品、pH3.7、EtOH 62.5% v/v)による各種ウイルスの不活性化効果

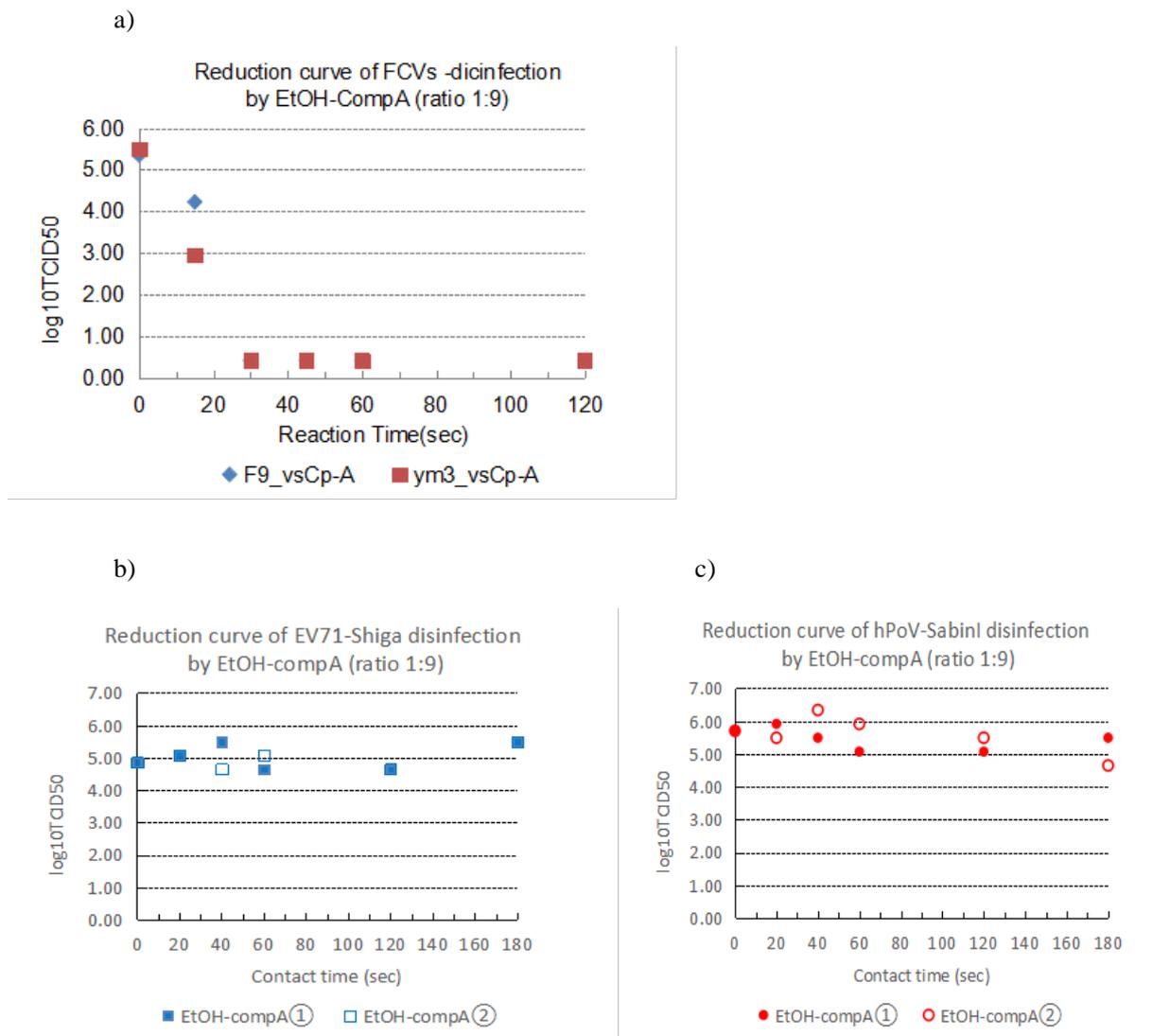


表 1. NaClO 200±ppm 処理による供試ウイルス感染価の経時的変化

ウイルス 反応時間	FCV-F9	FCV-ym3	MNV-S7	EV71_Shiga	hPoV_Sab I
0 (sec)	4.65	5.63	5.92	4.96	5.49
20	2.11	0.84	≤0.42	≤0.42	≤0.42
40	≤0.42	≤0.42	≤0.42	≤0.42	≤0.42
60	≤0.42	≤0.42	≤0.42	≤0.42	≤0.42

反応比率 NaClO : virus=1:9 単位 : log₁₀TCID₅₀

表 2. NaClO100ppm±ppm による供試ウイルス感染価の経時的変化

ウイルス 反応時間	FCV-ym3	EV71_Shiga
0 (sec)	5.63	4.96
20	4.22	≤0.42
40	4.22	0.84
60	3.80	0.84
120	3.80	≤0.42

反応比率 NaClO : virus=1:9 単位 : log₁₀TCID₅₀

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」
総合研究分担報告書(平成 28～30 年度)

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Ⅱ

研究分担者 高木 弘隆 国立感染症研究所
バイオセーフティ管理室

研究要旨

hNoV 不活性化評価用の代替候補ウイルス 6 種類からの絞込みとそのための評価用基本製剤 4 種類による経時的感染価減衰を検討した。その結果 FCV-F9 を基準株として比較し、臨床分離株である FCV-ym3、human coxsackievirus type A6(hCox-A6)が基本製剤に対し、広く抵抗性を示した。相乗効果的な新規製剤などを評価する上で前記 3 種類のウイルスが有力なツールとなりうることが示唆された。

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ており、前年度には代替候補となるウイルスについて様々な観点からアプローチし、その特性について検討した。今年度はこれらを元に「代替ウイルスの絞込み」を踏まえ、その特性評価の薬剤選定と候補ウイルスの反応特性を検証することとし、特にこれまでの検証でノロウイルス対策品として挙げられる塩素系薬剤(NaClO)や汎用されるエタノール製剤の実効性検証に効果的な複数のウイルス種の抽出・選定に注力することとした。加えて、このことによる試験用ウイルスや培養細胞、試験方法などの集約化・簡便化も図った。

B. 研究方法

1. 材料

a) ウイルス

- ①FCV ym3 株(臨床分離株、化学剤抵抗性)
 - ②Enterovirus type71(EV71); Shiga1095 株
 - ③human paechovirus-1(hPeV-1)
: 旧 echovirus-22/Harris 株
 - ④Human coxsackievirus typeA6(hCox-A6)
: Gdula 株 ATCC VR-1801
 - ⑤Human coxsackievirus typeB3(hCox-B3)
: Nancy 株 ATCC VR-30
 - ⑥Human coxsackievirus typeB5(hCox-B5)
: Fanllher 株 ATCC VR-185
- ②～⑥はウイルス二部・清水先生より
供与
*feline calicivirus

b) 使用培養細胞

- ①CRFK 細胞(JCRB9035)
- ②VERO 細胞(ATCC CCL-81)
- ③HCT-8 細胞(ATCC CCL-244)
- ④RD-A 細胞 (ウイルス 2 部より)

①は FCV、②は EV71、③は hPeV、④は Cox-A・B の各培養用として使用した。

c)使用培地

- ①2~5%FBS_EMEM
 - ②2~5%Horse serum_RPMI1640
- ①は CRFK、VERO、RD-A、②は HCT-8 に用いた。

d)使用薬剤

- ①NaClO (原液有効塩素 5%)
 - ②エタノール(EtOH 99.5%)
 - ③過酸化水素(H₂O₂、原液 30%)
 - ④炭酸ナトリウム(Na₂CO₃、0.5-1%)
- ①は花王株式会社製、②~④和光純薬製のものを精製水にて適宜希釈して供試した。

e)中和用培地：

- ①ClO 用：20mM Na₂S₂O₃ 含有各使用培地
- ②H₂O₂ 用：20 μg/ml Catalase 含有各使用培地
- ③炭酸 Na 用：重炭酸 Na 不含、10mM HEPES 含有各使用培地

2. 方法 1. エタノール製剤による供試ウイルス不活性化の比較検討

自家調整エタノールは混合時の終濃度が 60%あるいは 80%となるよう調製する(実濃度は 66.7%あるいは 88.9%)。供試ウ

イルス①~③について、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 15~最長 300 秒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 7⁻¹と)する。

希釈用 96well-microplate にて 7 倍段階希釈系(7⁻²~7⁻⁸)を作成し、これを予め用意した培養細胞 96well-microplate に 50 μl/well で接種した。36°C・5%CO₂にて 4~6 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. 炭酸ナトリウム(Na₂CO₃)および過酸化水素(H₂O₂)の各溶液によるウイルス不活性化の比較検討

Na₂CO₃は 0.5-1%溶液(1%=約 0.1M)を、H₂O₂については 30%原液を希釈し、0.5~2%液を調製した。供試ウイルス②及び③と各調製液の混合比を Na₂CO₃、H₂O₂共に 1:9 とし、マイクロチューブ内にて混合・反応を開始した。反応は最大 60 分までとし、反応液を経時的に採取し、ただちに中和用培地液②あるいは③にて 7 倍希釈し反応を停止(これを 7⁻¹と)した。

期借用 96well-microplate にて 7 倍段階希釈系(7⁻²~7⁻⁸)を作成し、これを予め用意した培養細胞 96well-microplate に 50 μl/well で接種した。36°C・5%CO₂にて 4~6 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 3. Human coxsackievirus(hCox-A、-B)による各種薬剤での不活性化比較検討

これまで hNoV 代替として検討してきた enterovirus を補完するものとして、NaClO に対して抵抗性を示す hCox-A および hCox-B が候補に挙げられたため、当所ウイルス第 2 部より 3 株を分与いただき、これらについて、定法に従って NaClO、エタノール(終濃度 80%)の不活性化効果を検討した。加えて hCox-A6 については 1%Na₂CO₃および 2%H₂O₂(反応比 1:9)の不活性化効果についても、定法に従い検討した。

(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. エタノール製剤によるウイルス不活性化について

FCV-ym3 株では FCV において EtOH の不活性化効果が最も高くなる 60%濃度においても、感染価減衰は反応 2 分以降ほぼ横ばいとなり 5 分後でも 3log₁₀TCID₅₀ の減衰に留まった(Fig.1)。これに対し、EV71 および hPeV-1 ではほぼ直線的に感染価減衰が起こり、EV71 では 4~5 分で、hPeV では約 5 分で 4log₁₀TCID₅₀ の感染価減衰に至った(Fig.2 および 3)。

結果 2. Na₂CO₃および H₂O₂ の各溶液によるウイルス不活性化について

1%Na₂CO₃ による不活性化について、EV71 では反応 10 分までに急激に感染価が減衰し、反応 20 分後には検出限界

(4log₁₀TCID₅₀ 以上の減衰)となった(Fig.4)。HPeV-1 では反応 60 分後まで感染価減衰は全く起こらなかった(Fig.5)。

H₂O₂ による不活性化については、EV71 では 1%以上で反応 20 分以降からわずかに感染価が減衰するに留まった(Fig.6)。hPeV-1 では 0.5%から感染価減衰が認められ、1%で反応 40 分後、2%で反応 20 分後に 4log₁₀TCID₅₀ 以上の感染価減衰に至った(Fig.7)。参考までに FCV-ym3 の 2%H₂O₂(反応比 1:4)による感染価減衰を Fig.8 に示す。

結果 3. hCox-A6、-B3 および-B5 の各種製剤による不活性化について

最初に NaClO 150ppm での hCox-A6 と hCox-B5 の不活性化効果について検討したところ、hCox-A6 で若干の抵抗性が認められた(Fig.9)。次にエタノール終濃度 80%での hCox3 種類の不活性化効果を比較したところ、hCox-B3 および B5 は反応 20 秒で 4log₁₀TCID₅₀ 以上感染価が減衰したが、hCox-A6 は反応 5 分後でも 2log₁₀TCID₅₀ 以内の減衰のとどまった(Fig.10)。

これらの結果より hCox-B2 種は候補より外し、hCox-A6 の各種製剤による不活性化を確認したところ、NaClO については 50-100ppm では FCV-ym3 同様に反応 5 分でも全く感染価は減衰せず、200ppm でも反応 1 分後でわずかな感染価残存が認められた(Fig.11)。2%H₂O₂ では反応 60 分でも感染価は減衰せず(Fig.12)、1%Na₂CO₃ では反応 5 分以降でほぼ直線的な感染価減衰がみられ、40 分以降で 4log₁₀TCID₅₀ 以上の減衰に至った(Fig.13)

D. 考察

代替候補ウイルスによる4種類の製剤を用いた不活性化効果について、前年度及び今年度のデータを表にまとめてみると(Table.1)、これまで汎用されてきたFCV-F9に対して、供試製剤により抵抗的なものはFCV-ym3とhCox-A6であった。ノロウイルスと同属であるということで、汎用されてきたマウスノロウイルス(MNV)については各種製剤すべてに高い感受性を示している。またこれまでFCV-ym3及びMNVはNa₂CO₃に対して抵抗性であるとしてきたが、その後のデータ解析の結果、1次線形解析が可能であり、各々高い感受性を有することが示唆された(追補データ参照)。

ヒトノロウイルスに関して集団発生事例から散見されるように、その感染制御はかなり困難であり、今後これを目的とした製剤には高い不活性化能が求められることは現時点で必然的である。hCox-A6は流行疫学的にも近年初夏でのヘルパンギーナ・手足口病からの主たる分離株であり、大きな意義を持つと考える。また本ウイルスはクエン酸・リンゴ酸などの有機酸に対しても抵抗性を示すことがわかっている(データ示さず)。よって有機酸に対して高い感受性を示すFCVの補完ウイルスとしても重要な役割をなすこととなる。しかしながら今回供試したGdula株は1949年に分離された株でもあり、近年の分離株との特性比較は確認しておくことが望ましいと考える。

評価ガイドラインに使用する代替ウイルスは、これまでの不活性化に関する報

告実績も鑑み、基準株としてFCV-F9、「相乗効果」を狙った合剤など評価用としてFCV-ym3及びhCox-A6の3種類とすることを考えている。今後この3種類により評価手法およびその妥当性や再現性について検証を行う。

E. 結論

2年にわたり、hNoV不活性化評価にかかる代替ウイルスの選定およびその方法について検討し、今回3種類のウイルス、FCV-F9、FCV-ym3、hCox-A6に絞り込んだ。今後これらを用いての評価条件設定や市販製剤などによる評価の妥当性・再現性について検証する。

【謝辞】

本研究の実施にあたり、ウイルス株及び培養細胞の分与を賜りました国立感染症研究所・ウイルス第2部 清水博之室長に深謝いたします。

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(1) 第38回日本食品微生物学会学術総会 2017年10月 徳島

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

Fig.1)

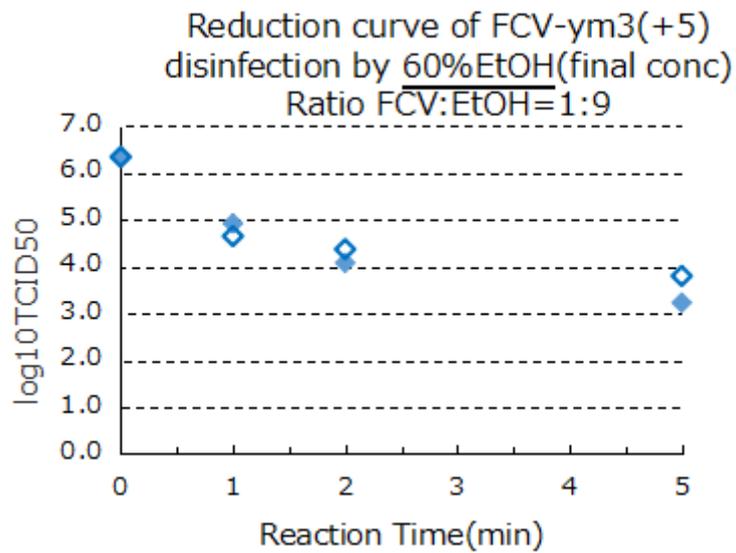


Fig.2)

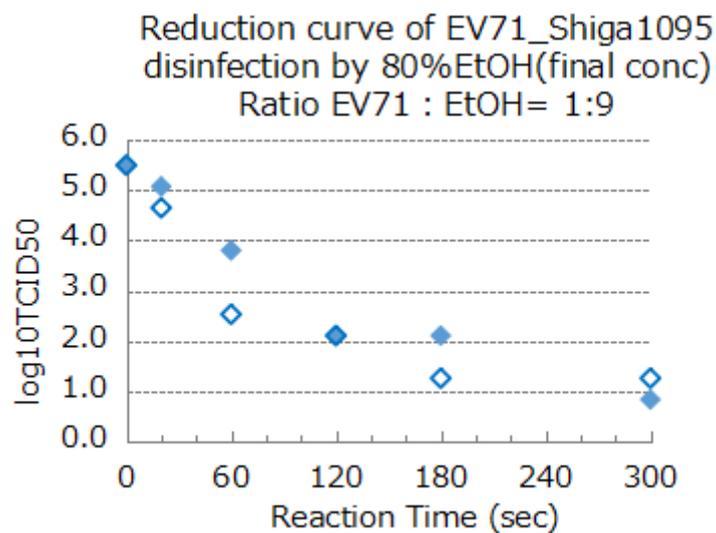


Fig.3)

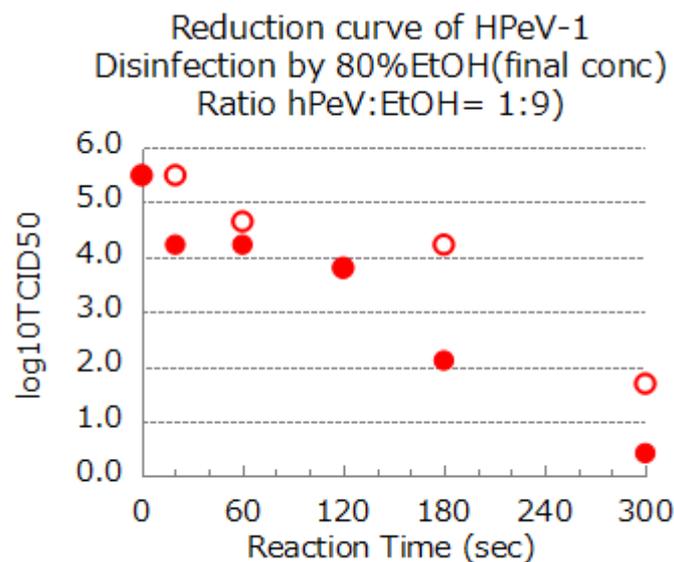


Fig.4)

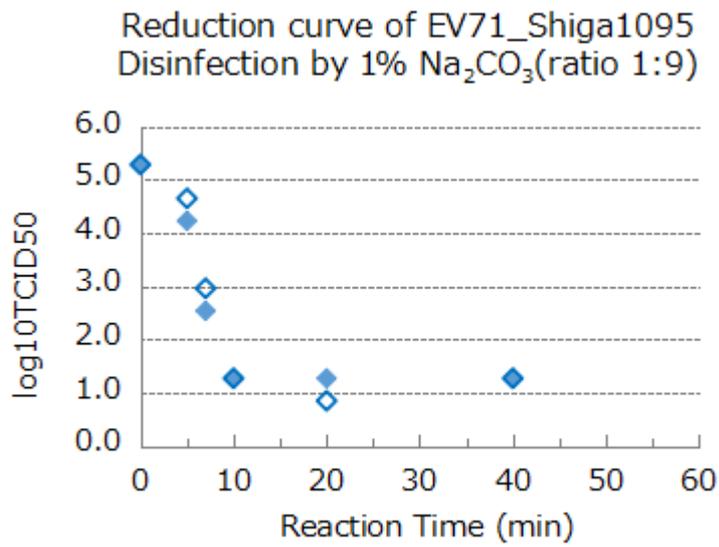


Fig.5)

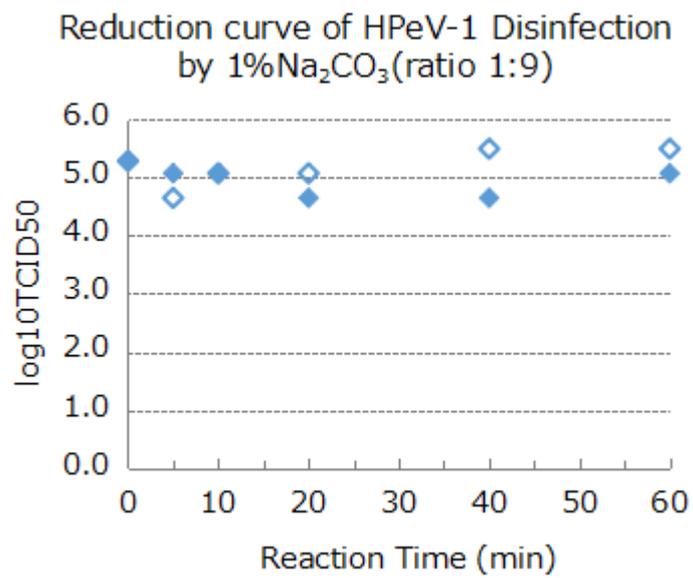


Fig.6)

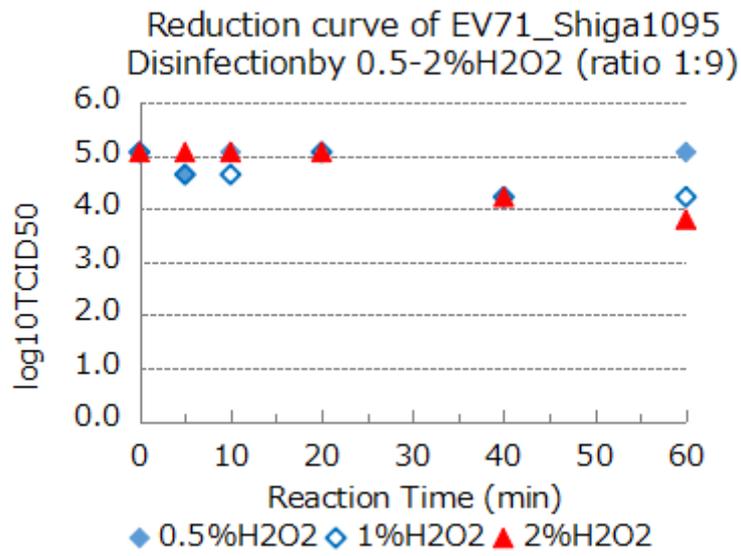


Fig.7)

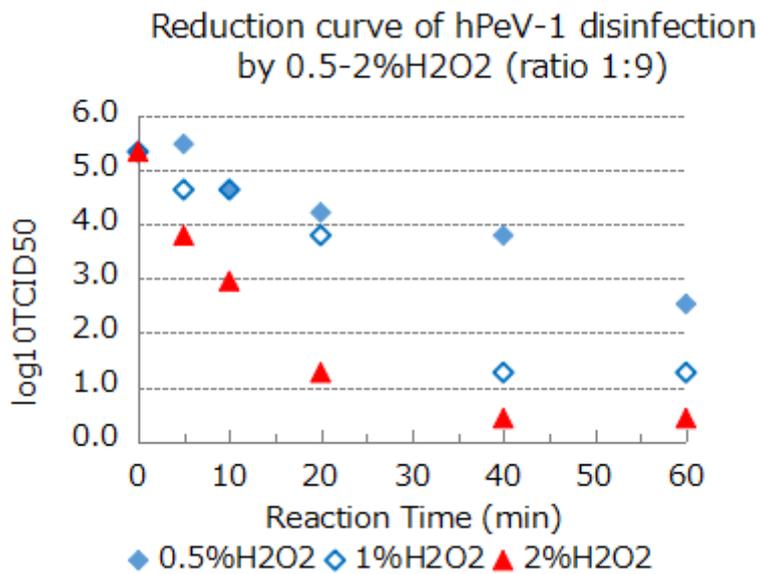


Fig.8)

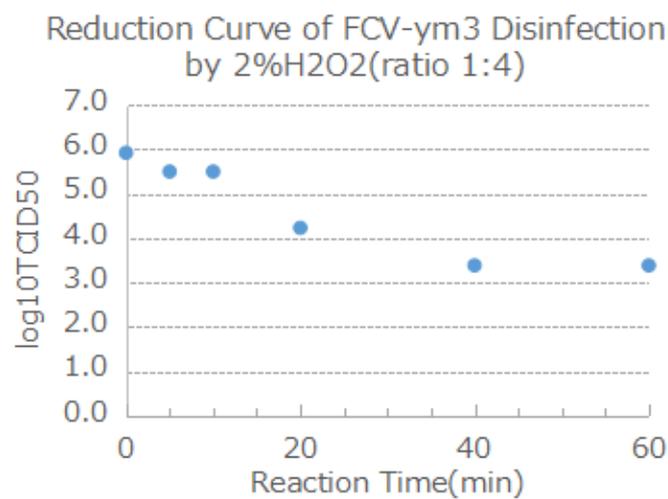


Fig.9)

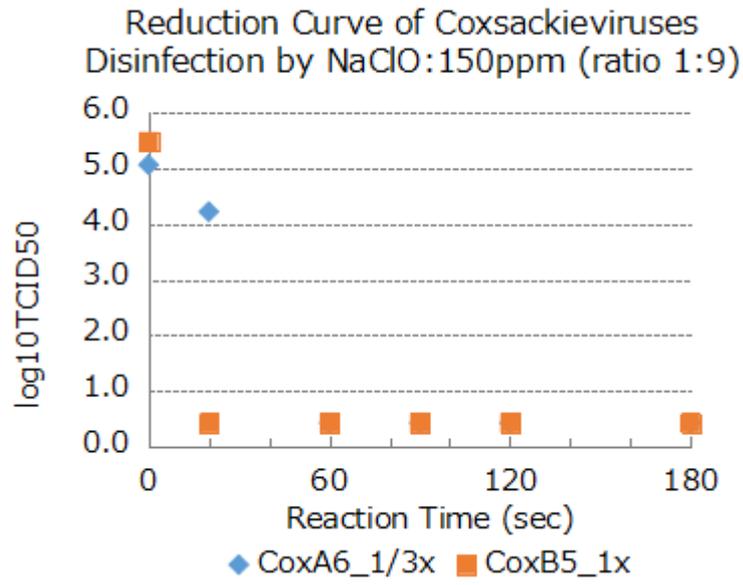


Fig.10)

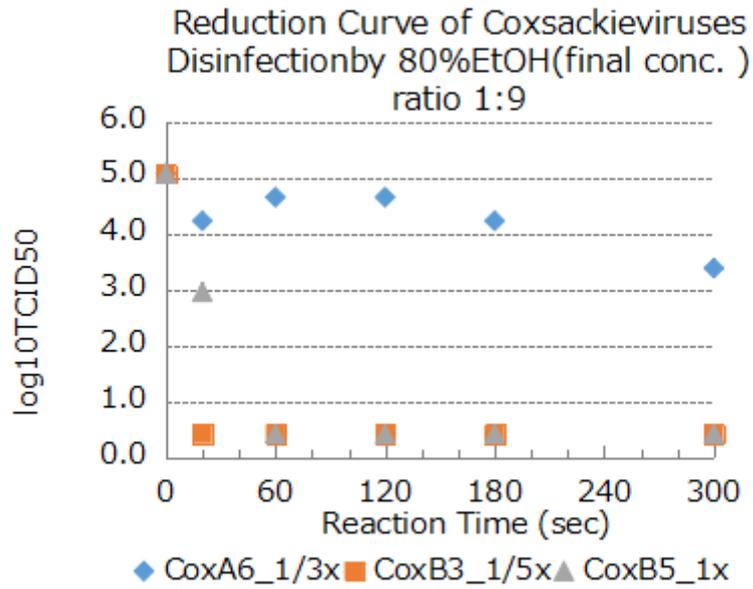


Fig.11)

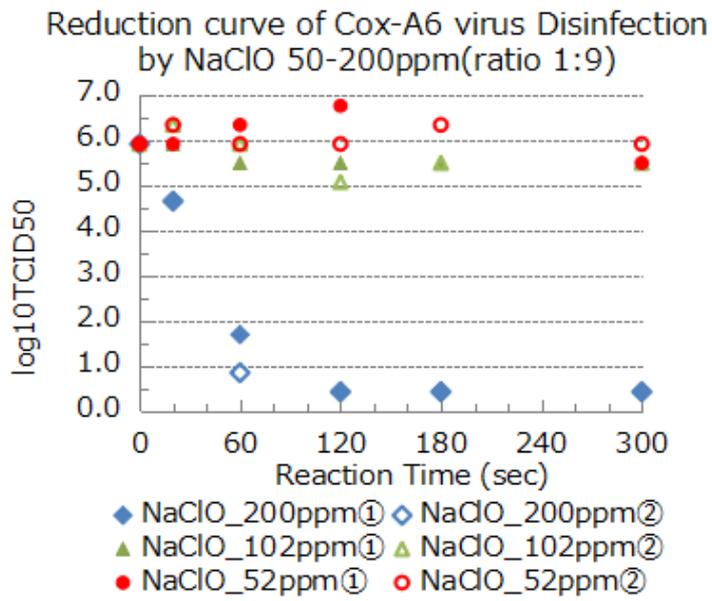


Fig.12)

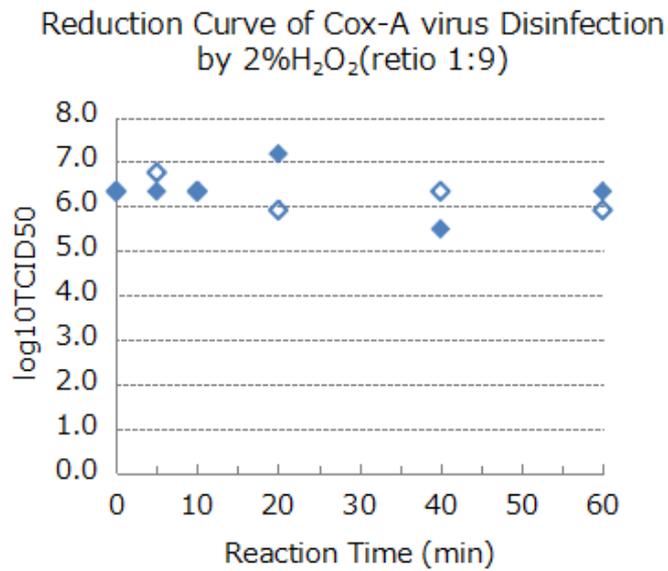
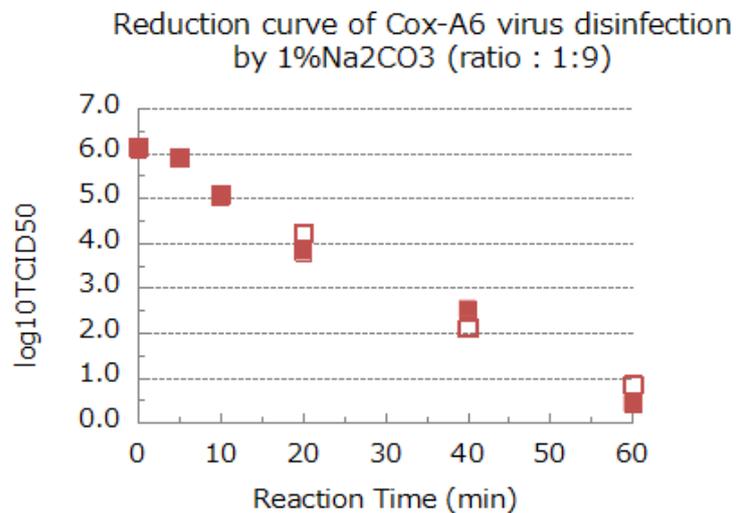


Fig.13)

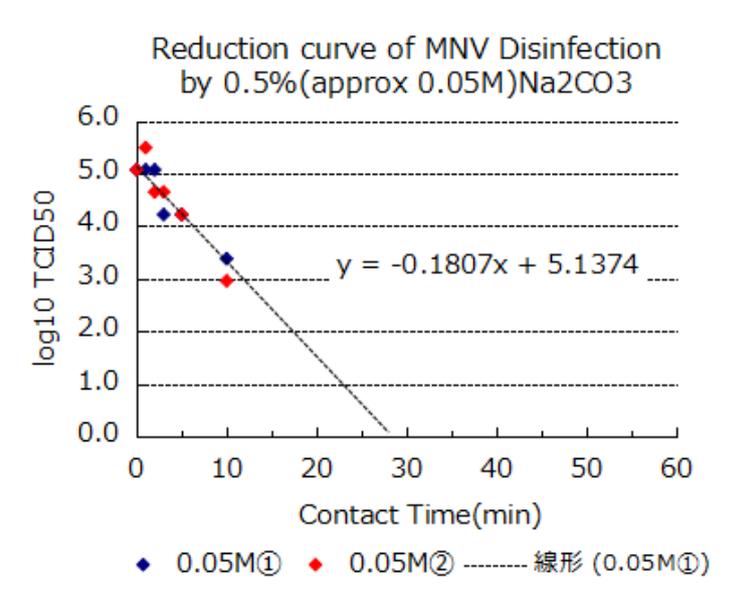


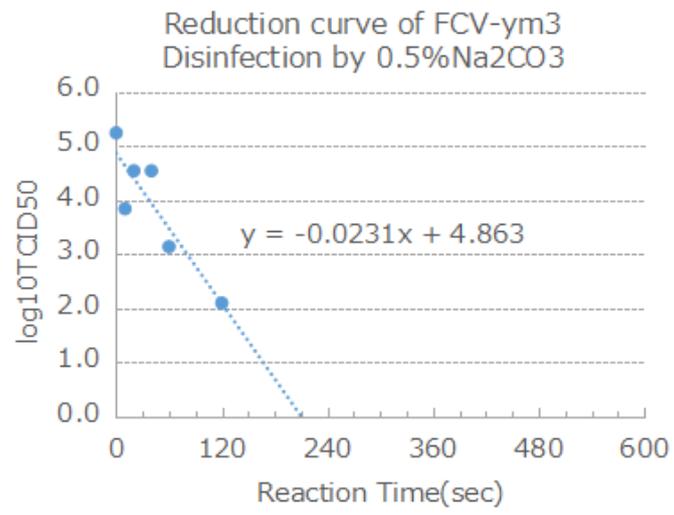
	NaClO	Ethanol	H ₂ O ₂	Na ₂ CO ₃
FCV-F9	100ppm 20sec	F50% 5min	2% ~60min	0.5% ~1min
FCV-ym3	200ppm 20sec	F60% LE	2% LE	0.5% ~3min
MNV-S7	100ppm 60sec	F50% 40sec	0.5% ~60min	0.5% 25-30min
hPeV-1	100ppm 40-60sec	F80% ~5min	1% ~40min	1% LE
EV71	100ppm 20sec	F80% 4-5min	2% LE	1% 10-20min
hCox-A6	200ppm 60sec	F80% LE	2% LE	1% ≥40min

Table.1)

LE : low effective (最大反応時間で $<3\log_{10}TCID_{50}$ の減衰) F : 反応時終濃度

《追補データ》





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：Na₂CO₃(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 Na₂S₂O₃ 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 7⁻¹と)する。

希釈用 96well-microplate にて 7 倍段階希釈系(7⁻²~7⁻⁸)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%CO₂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 7⁻¹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 (Na_2CO_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)、 Na_2CO_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%)、Na₂CO₃(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。

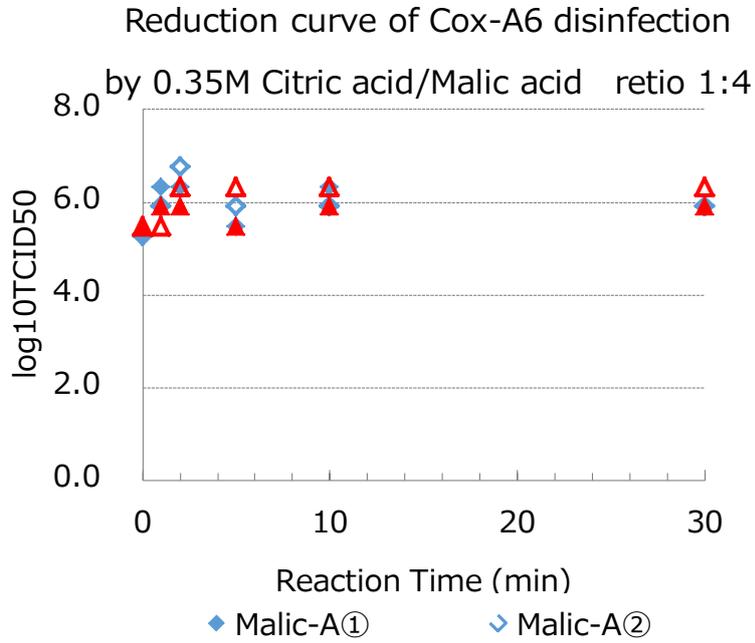
F. 研究発表

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.

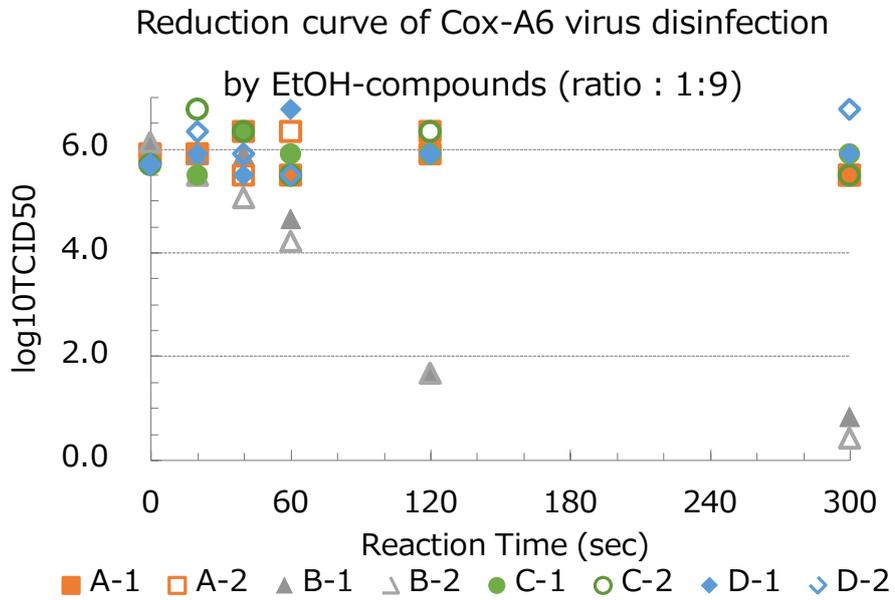


図 3.

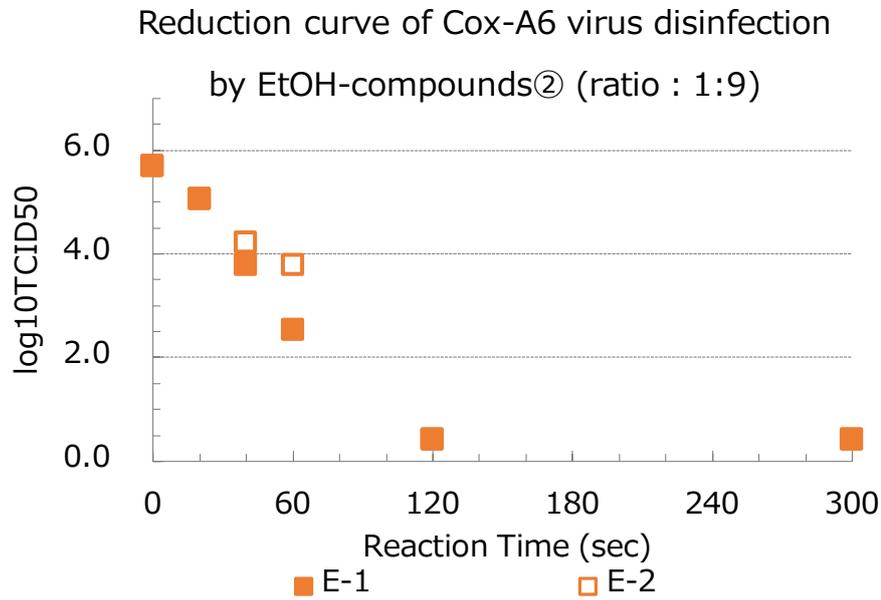


図 4.

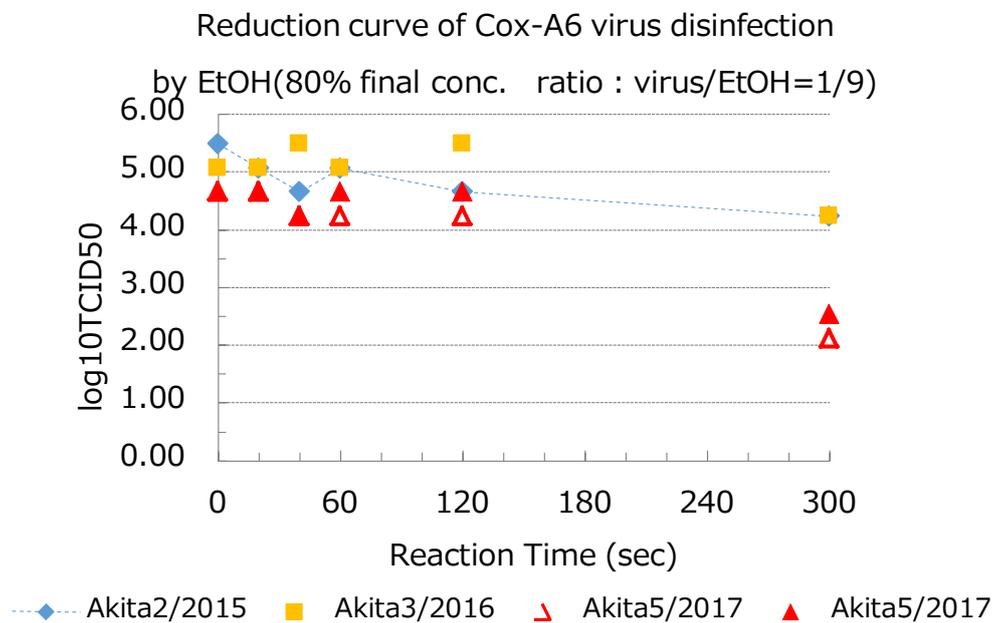


図 5.

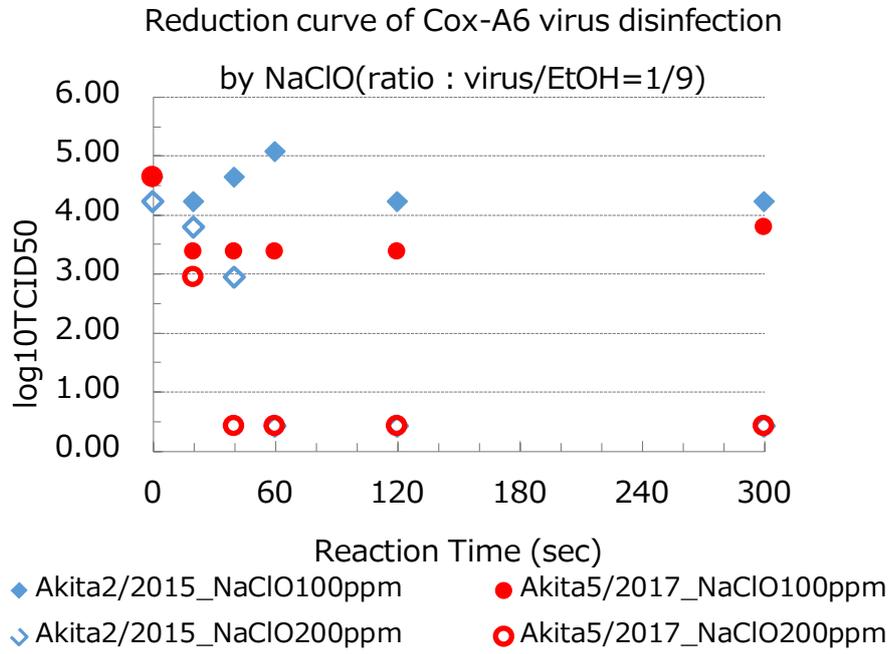
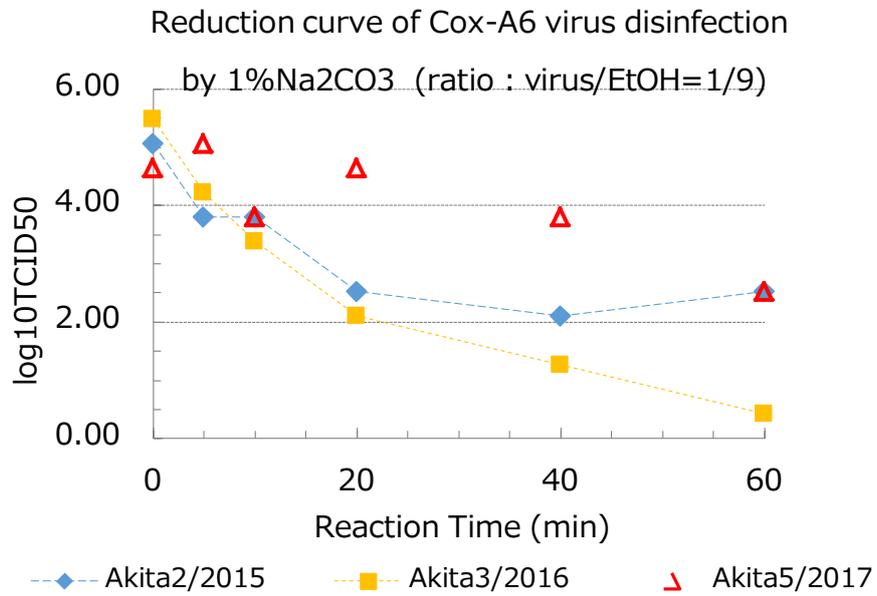


図 6.



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

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
	岡 智一郎	国立感染症研究所

研究要旨

食品媒介性/介在性ウイルスのひとつであるヒトサポウイルス(hSaV)の培養系について、ブタサポウイルスの培養系を応用する形で試みた。その結果、いくつかの培養細胞/コール酸類の組合せで、培養上清中のウイルス RNA のシグナル増加、及び RNA コピー数の経時的増加が認められた。今後 second-culture でのウイルス粒子回収や感染価による評価系への応用に向けて、引き続き検討を行う。

A. 研究目的

本研究班における筆者の主要分担研究課題は「代替ウイルスによる不活性化評価」の道標たるガイドラインを設けることであるが、同時に代替ウイルスを用いない、すなわちヒトノロウイルスあるいはヒトサポウイルスを直接培養・増殖する方法の確立を目指すことは、不活性化評価のみならず、食品の汚染状況やヒト介在の場合の汚染拡散状況を把握し、そのリスク解析や感染防御の上で多大な貢献をもたらす。今回 Chang らの報告¹⁾にあるブタサポウイルス増殖系を応用して、従来とは異なる細胞/コール酸類を用いて当該ウイルスの増殖系の構築を試みた。

B. 研究方法

1. 材料

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

・培養細胞:

ヒト由来培養細胞 4 種類(sub-clone 1、市販 2、取扱中止品 1)、動物由来細胞 sub-clone 1 種類

・培地:

クラシカル培地より自家変法調製した。

・コール酸類:

胆汁末を含めた 5-6 種類を各培養細胞に合わせて調製した。

・RNA 抽出:

Roche High Pure Total RNA isolation kit

・RT kit:

ReverTra Ace@(TOYOBO)

・PCR kit:

KAPA2G Fast-HS(KAPA Bioscience)

・Real-time RT-PCR:

Oka らの手技による^{2),3)}

- #### 2. 方法 1 培養細胞への検体接種・培養
- 各細胞を 12well あるいは 24well-plate

に播種し、90-100%シートを形成したところで、コール酸類含有培地に交換し、処理済みサポウイルス陽性便上清 5-10 μ l/well で接種し、吸着後 2 回洗浄した。培地を交換して 5-8 日間培養し、その培養上清を回収した。

3. 方法 2 培養上清からの RNA 抽出・RT-PCR

培養上清 100 μ l より RNA として 70 μ l を抽出した。これを 5 μ l、pdN7、ReverTra Ace 30U, RNase inhibitor を含む反応液 10 μ l を調製した。これを 30°C・10 分、42°C・30 分、95°C・5 分で反応させ、cDNA 合成した。

この cDNA を template として 2 μ l、forward・reverse primer 10 μ M を各 1 μ l、KAPA2G Fast-HS 2×mix を含む反応液 20 μ l を調製した。これをまず 95°C・3 分で変成させ、95°C・20 秒、52°C・20 秒、72°C・5 秒の反応を 35 回繰り返す、最後に 72°C・2 分の伸長反応を行った。PCR 産物を 2.3% agarose gel に 7 μ l/lane で接種し、電気泳動を行って geno-specific product の確認とシグナル強度を確認した。使用した primer set は別表に示した^{4),5)}。

4. 方法 3 接種材料のウイルス RNA 保存性チェック

サポウイルスは IC キットなどの簡易検査キットが存在しないため、陽性検体中のウイルス粒子の存在状況について接種前に確認するための暫定的な方法として、前記方法 2 のうち、cDNA 合成過程において、pdT₃₀-primer を使用し、ウイルス RNA の 3'end から cDNA 合成を行い、その後方法 2 と同様の PCR・agarose 電気泳動により、その保存性をチェックすることとした。

(倫理面への配慮)

本研究では、特定の研究対象者は存在

せず、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ない。

C. 研究結果

1. 結果 1 hSaV 接種培養上清における hSaV 特異遺伝子のシグナルについて

供試した細胞とコール酸類の組合せにより、そのいくつかで培養上清よりウイルス RNA の強いシグナルが確認された。また別法により経時的な RNA コピー数も測定したところ経時的増加も認められ、増加率は $10^3 \sim 10^4$ 倍であった。これらは hSaV-GI, GII、および GIV で確認された。

2. 結果 2 接種材料中のウイルス RNA 保存性と RNA コピー数、接種・ウイルス RNA シグナル増加との関連性について

福岡由来 7 検体については保存性良好と考えられるものは 3 検体で、RNA コピー数は 10^5 copies/10 μ l のオーダーであった。秋田由来 24 検体については保存性良好と考えられたものが 17 検体、RNA コピー数は $10^4 \sim 10^8$ copies/10 μ l であった。

これらを方法 1 に従って培養細胞に接種した結果、培養上清中でのウイルス RNA シグナル増加が認められたのは、全て秋田由来検体であり、その RNA コピー数は 10^5 copies/10 μ l 以上のものであった。

D. 考察

今回 hSaV の培養系検討において、初めて培養上清中にウイルス RNA シグナル増加、およびコピー数の経時的増加を認めた。しかしながら second passage によるウイルス RNA 増加はまだ認めれておらず、primary-culture sup からの超遠心法によるウイルス回収やその電顕画像より考えられる要因を抽出し、現在検討に入っ

ている。

また検体からのウイルス増殖の可能性については現行の培養法ではその感度はあまり高くないと考えられるが、別の要因として、①検体中の感染性ウイルスの存在状態、②「感染粒子」とするトリガーの存在可否、などが挙げられる。

①については検体そのものの調製・保存状況でも明らかであり、今回福岡由来検体では、培養によるウイルス RNA シグナル増加は認められなかった。福岡由来検体と秋田由来検体の相違は保存液の組成であり、福岡では遺伝子検査・検出に特化して、陽性便懸濁を精製水で、一方の秋田では RS ウイルス検体保存用 medium をベースに modify した保存液を使用していた。

接種材料のウイルス RNA 保存性チェックにおいて同等の保存性シグナル・RNA コピー数を示したにも関わらず、RNA シグナル増加に大きな差が出たことは、保存液の組成の差を要因とすることを認めない。同様にウイルスの安定性そのものが不明であるため、患者の状態・採取のタイミングなどの要因が感染粒子状況に関与することも認めず、今後更に検証する必要がある。

また②については感染・発症における侵入門戸を腸管とする場合、そこに至るまでの様々な消化管通過を考慮すると、その過程での作用により、「感染性粒子として仕立てられる」ことも大いに考えられる。新規培養系検討としてはこのように様々な因子を考慮してゆく必要があるだろう。

最後に現行手法では顕著な細胞変性などは認められないため、将来的に感染価による評価系を目指すのであれば、効率的な感染細胞検出手法も合わせて検討する必要がある。

E. 結論

今回 hSaV に関して、陽性検体を出発材料とした培養系の検討を行った。その結果、いくつかの供試培養細胞/コール酸類の組合せで、培養上清中にウイルス RNA シグナル、および経時的コピー数の増加が認められた。今後更に検討を進め、感染粒子の安定的回収や評価系への応用を試みる。

【謝辞】

本研究にあたり、培養上清中ウイルス粒子の撮影・観察にご協力いただきました国立感染症研究所 電顕室 片岡紀子様 に深謝いたします。

参考文献>>

- 1)Chang, et al, PNAS vol.101 NO.23 8733-8738
- 2)Oka et al, J Med Virology 2006 Oct; 78(10):1347-53
- 3)食品衛生検査指針 微生物編 2015 年版
- 4)Okada, et al, Arch virol(2006) 151: 2503-2509
- 5)Kitajima, et al, APPL.Environ.Microbiol, Apr. 2010, p 2461-2467

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

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」
総合研究分担報告書(平成 28～30 年度)

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^{文献}。

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-H₂O₂-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 10⁵~10⁶ copies/10 μ 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 10⁴ copies/10 μ 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 1.1×10^9 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、ウィルスパネル・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

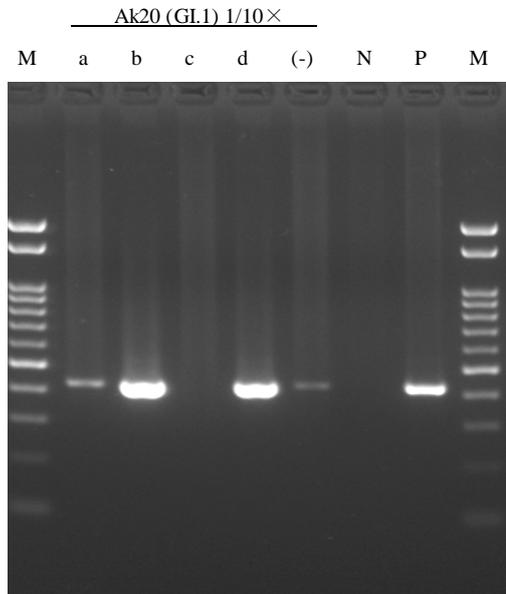
G. 知的財産権の出願・登録状況

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

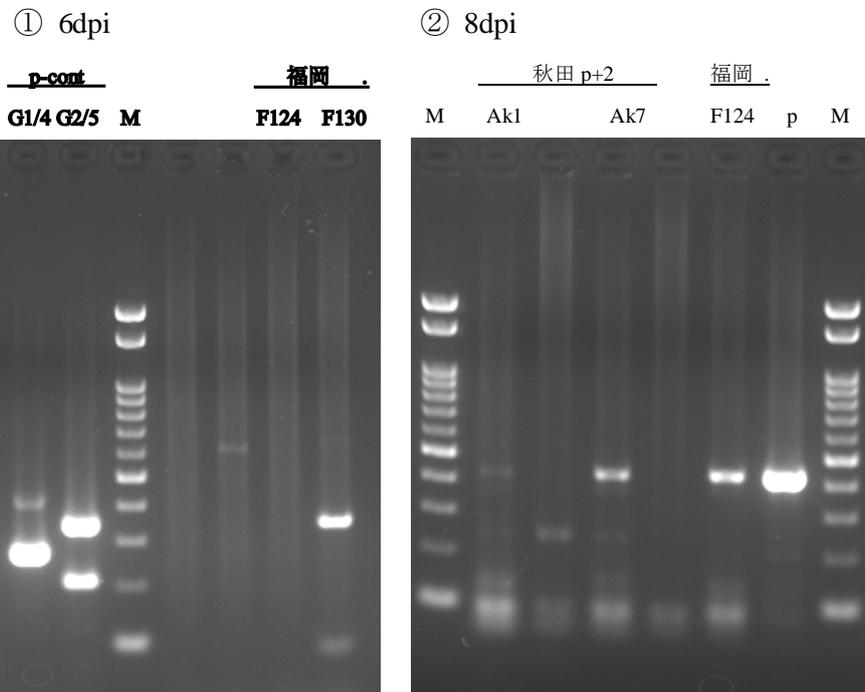


秋田由来検体 Akita20(Ak20:GI.1)を
10 希釈(6.9×10^6 copies/ 10μ l)して各
well に接種、既法に従い吸着後に洗
浄・培地交換を行い、6.5 日培養。
上清を回収し、RNA 検出と定量を行
った。
☆a~d はサプリメント、(-)はサプ
リ無添加

定量結果：

- ・ サプリ b : 1.34×10^6 copies/ 10μ l
- ・ サプリ d : 2.34×10^5 copies/ 10μ l

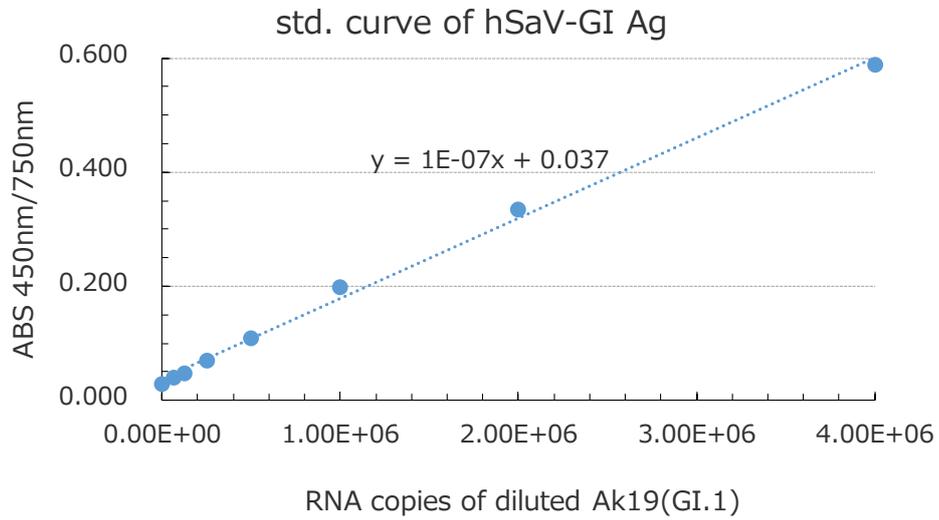
図 2. 新規細胞 B による低 RNA コピー-hSaV サンプルの増殖 trial



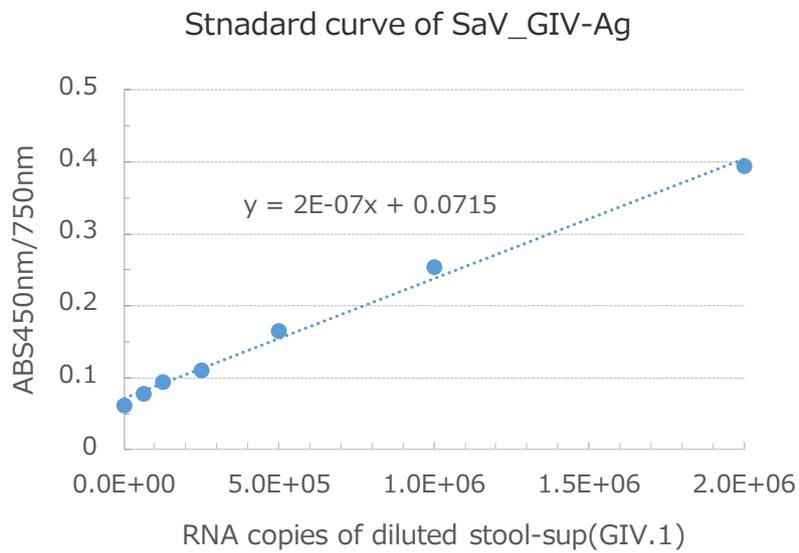
F124(GI.2) : 3.4×10^5 copies/well、F130(GI.3) : 5×10^4 copies/well で
接種。各々の培養上清では、 2.8×10^3 、 $2.2 \times 10^4/100 \mu$ l となった。

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



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」
総合研究分担報告書(平成 28～30 年度)

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 α -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 α -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 2.01×10^6 コピー添加した際の回収率は 3.61%であったが、 1.46×10^5 コピー添加の場合は 5.34%、 1.00×10^4 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、 1.16×10^5 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、「沈殿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」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) Hiroyuki Saito, Miho Toho, Tomoyuki Tanaka and Mamoru

Noda: Development of a practical method to detect noroviruses contamination in composite meals. *World Biomedical Frontiers*, <http://biomedfrontiers.org/inf-2016-3-5/> (2016).

2) Hiroko Sato, Chihiro Shibata, Wakako Akino, Hiroyuki Saito, Shihoko Saito, Naota Monma, Akira Toukairin, Mamoru Takahashi, Hiromi Fujita, Teruki Kadosaka, Nobuhiro Takada, Hiroki Kawabata and Shuji Ando: Survey of *Leptotrombidium akamushi* in Omono river basin in Akita Prefecture, Japan in 2011~2014. *Med. Entomol. Zool.*, **67** (3), 167-175 (2016).

3) Hiroyuki Saito, Miho Toho, Tomoyuki Tanaka and Mamoru Noda: "PANtrap": A Novel Detection Method for General Food Samples. In Paul K. S. Chan, Hoi ShanKwan and Martin C. W. Chan (Eds.) *THE NOROVIRUS*. New York: Academic Press, pp145-153 (2016).

4) Hiroko Sato, Chihiro Shibata, Yoko Fujiya, Wakako Akino and Saito H: Epidemiology of scrub typhus in Akita Prefecture, 2007-2016. *Infectious Agents Surveillance Report*, **38** (6), 5-6 (2017).

5) Hiroyuki Saito, Wakako Akino, Hiroko Sato, Yoko Fujiya, Chihiro Shibata, Ryoetsu Sato and Hiroyuki Shimizu: Isolation of enterovirus D68 using suckling mice. *Infectious Agents Surveillance Report*, **38** (10), 11-12 (2017).

6) 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).

7) 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).

8) 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).

9) 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).

10) 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) 今野貴之、高橋志保、熊谷優子、斎藤博之:サルモネラの血清型別への遺伝子検査法からのアプローチ、第 27 回秋田応用生命科学研究会講演会、2016、秋田

2) 斎藤博之、佐藤寛子、早川智、牛島廣治:ノロウイルス GII.P17-GII.17 に再感染した症例における免疫応答、第 57 回日本臨床ウイルス学会、2016、郡山

3) Hiroyuki Saito, Miho Toho, Mamoru Noda, Tomoyuki Tanaka: Noroviruses RNA detection in contaminated foods by a PANtrap method. 第 11 回日中国際ウイルス学会、2016、観音寺

4) 斎藤博之、秋野和華子、野田衛:ノロウイルス遺伝子型別の効率化に関する検討、第 37 回日本食品微生物学会学術総会、2016、東京

5) 秋野和華子、斎藤博之、野田衛:市販生カキからのノロウイルス・サポウイルスの検出と秋田県内における流行状況の推移、第 37 回日本食品微生物学会学術総会、2016、東京

6) Ushijima H., Saito H., Shimizu Y., Sato H., Thongprachum A., Khamrin P., Okitsu S., Takanashi S., Maneekarn N. and Hayakawa S.: Immune response against different genotypes of noroviruses in two adults with the recurrent infection. 第 6 回国際カリシウイルス学会、2016、Savannah

7) Hiroyuki Saito, Yuko Shimizu, Hiroko Sato, Wakako Akino, Satoshi Hayakawa and Hiroshi Usijima :

Immunological response in a patient of norovirus GII.P17-GII.17 infection. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会、2016、札幌

8) 斎藤博之、秋野和華子、野田衛:疫学的視点から見たノロウイルス GII.P17-GII.17 型の病原性に関する一考察、第 112 回日本食品衛生学会学術講演会、2016、函館

9) 斎藤博之、秋野和華子、佐藤寛子、清水優子、早川智、牛島廣治:ノロウイルス GII.17 感染に伴う免疫応答と病原性に関する一考察、秋田応用生命科学研究会第 28 回講演会、2016、秋田

10) 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:生カキが原因でノロウイルスに感染した症例におけるノロウイルス排泄状況と抗体価の推移、第 29 回秋田応用生命科学研究会講演会、2017、秋田

11) 斎藤博之、佐藤寛子、早川智、牛島廣治:生カキ喫食後の胃腸炎症例におけるノロウイルス排泄状況と免疫応答、第 58 回日本臨床ウイルス学会、2017、長崎

12) 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:パンソルビン・トラップ法の捕捉抗体供給源としてのガンマグロブリンの再評価、第 38 回日本食品微生物学会学術総会、2017、徳島

13) 秋野和華子、斎藤博之、野田衛:市販生カキにおけるノロウイルス汚染の定量的調査、第 38 回日本食品微生物学会学術総会、2017、徳島

14) Hiroyuki Saito, Yuko Shimizu, Hiroko Sato, Wakako Akino, Satoshi Hayakawa and Hiroshi Usijima :

Immunological response in a patient of noroviruses infection associated with raw oyster. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会、2017、大阪

15) 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: ノロウイルス GII.17 に対するパンソルビン・トラップ法の有効性に関する検討、第 113 回日本食品衛生学会学術講演会、2017、東京

16) 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

17) 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 20th meeting EUROPIC, Egmond aan Zee, The Netherland (2018).

18) 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

19) 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

20) 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

21) 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

22) 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

23) 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

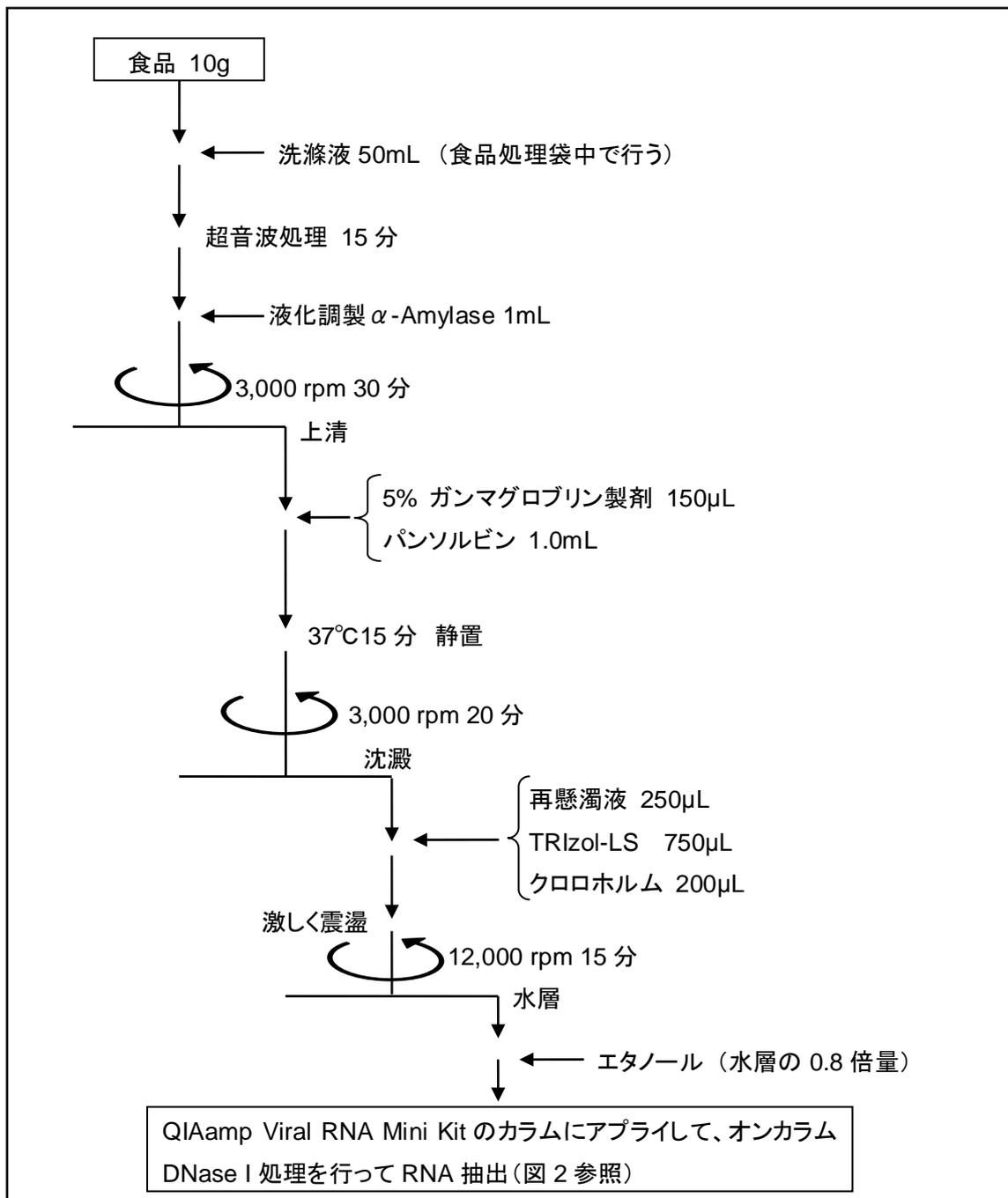


図 1 パンソルビン・トラップ法の操作手順

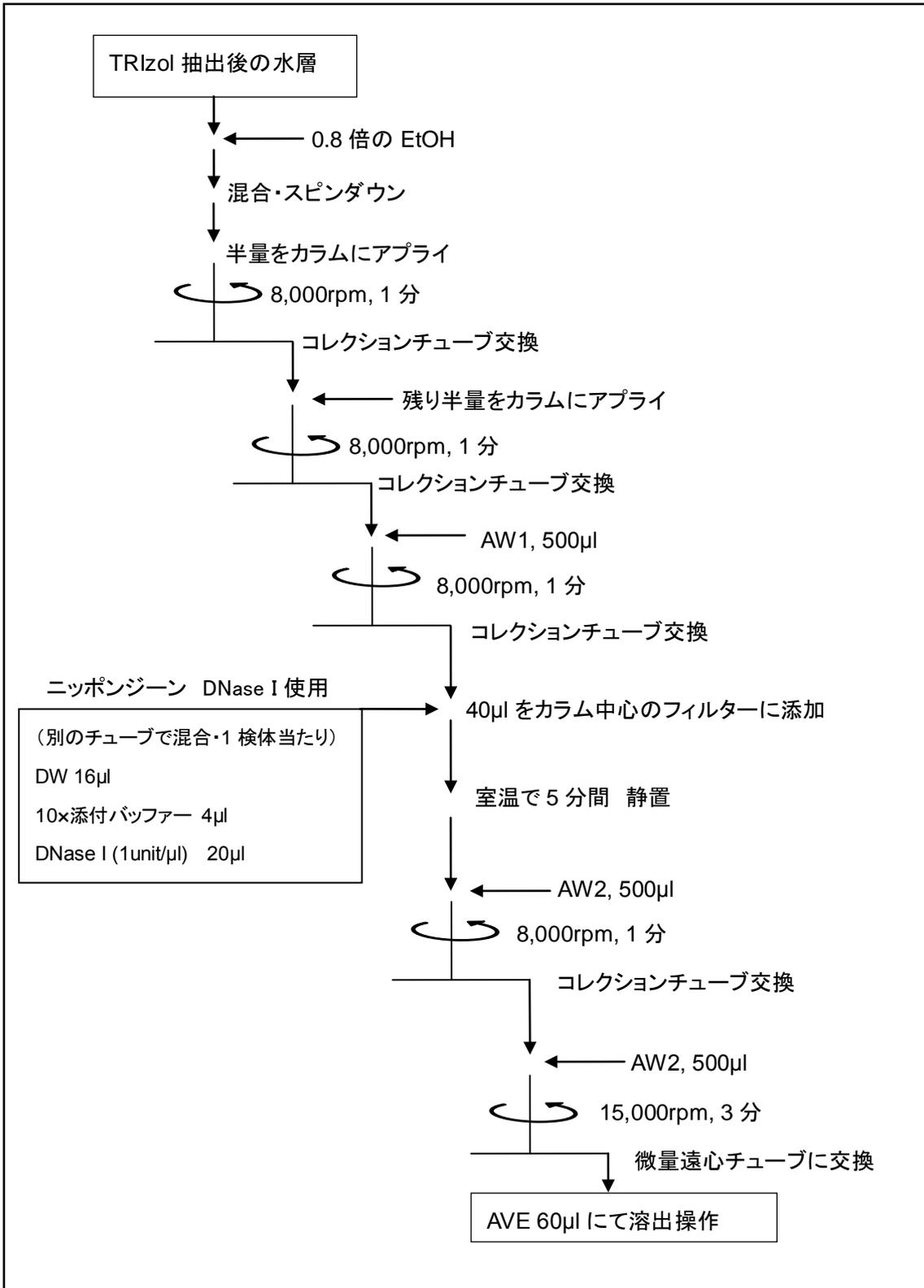


図 2 QIAamp Viral RNA Mini Kit へのオンカラム DNase I 処理の組み込み

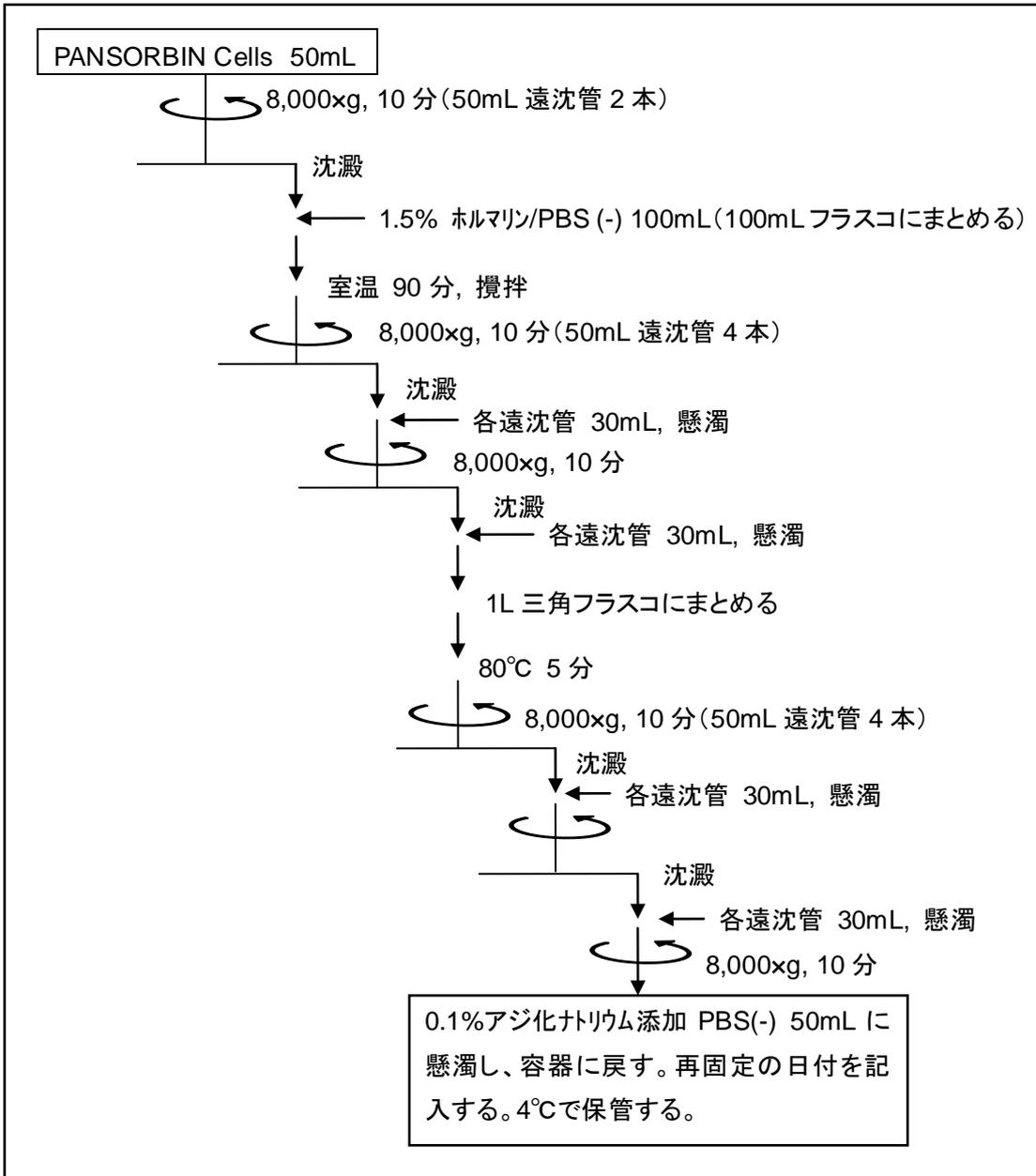


図3 パンソルビン再固定の手順

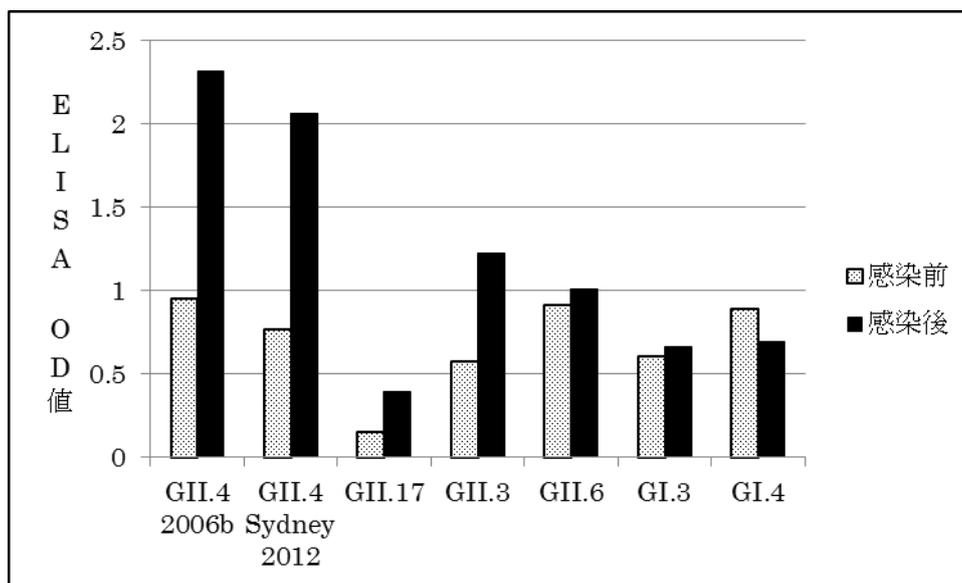


図4 NoV GII.4 感染時における血清 IgG の応答 (ELISA OD 値)

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	2.01×10^6	7.23×10^4	3.61
GII.17	1.46×10^5	7.80×10^3	5.34
GII.17	1.00×10^4	1.06×10^3	10.60
GII.4(参考値)	1.16×10^5	2.90×10^4	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	1.43×10^5	1.05×10^4	7.35
焼きそば	1.32×10^5	6.67×10^3	5.04

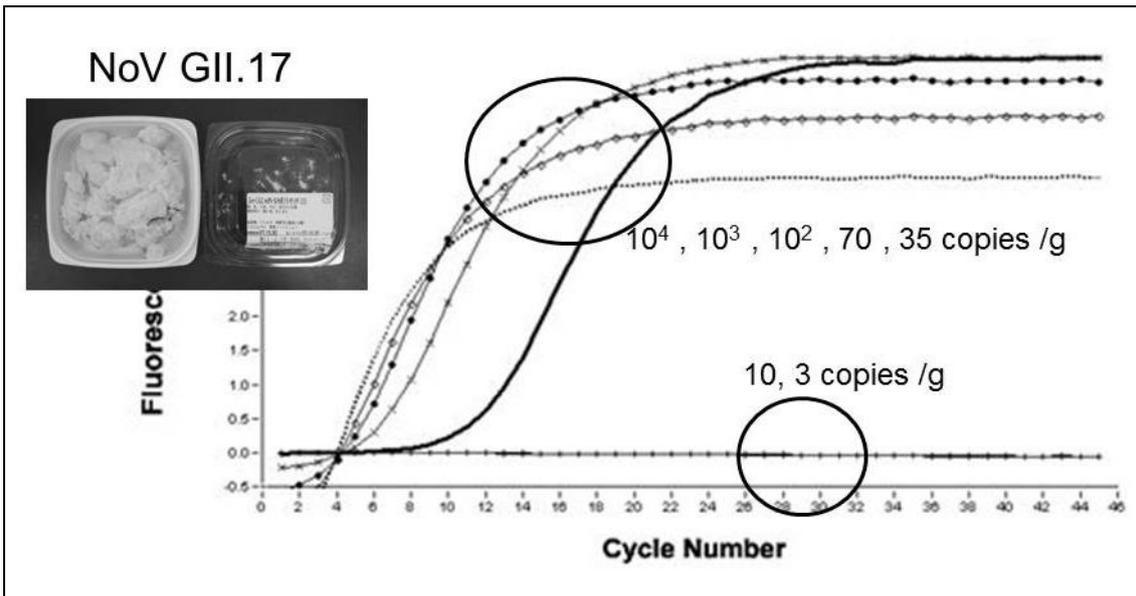


図 5A Nested real-time PCR による検出限界 (ポテトサラダ)

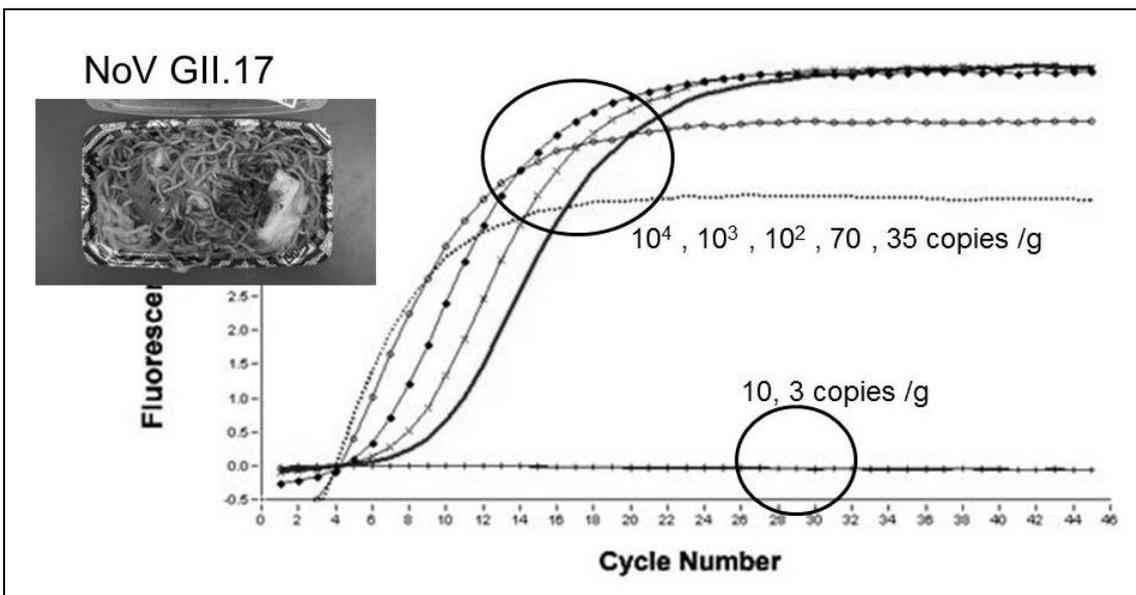
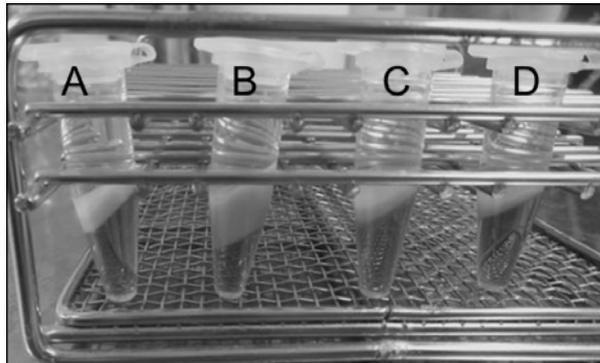
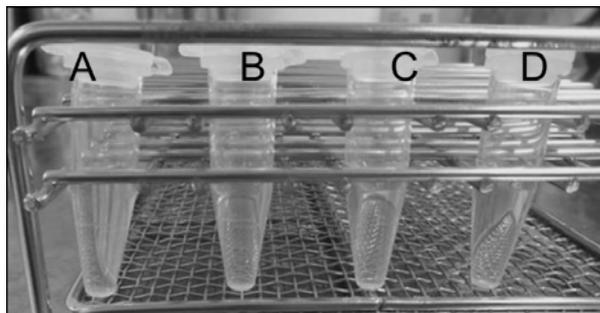


図 5B Nested real-time PCR による検出限界 (焼きそば)

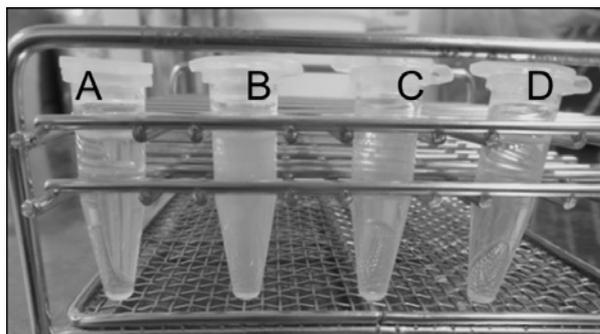
TRizol-LS /クロロホルム
で抽出し、遠心した状態



水層を分取した状態



0.8 倍量 のエタノールを
添加したところ白濁した
状態(B、C、D)



遠心によって確認された
沈殿物(B、C、D)

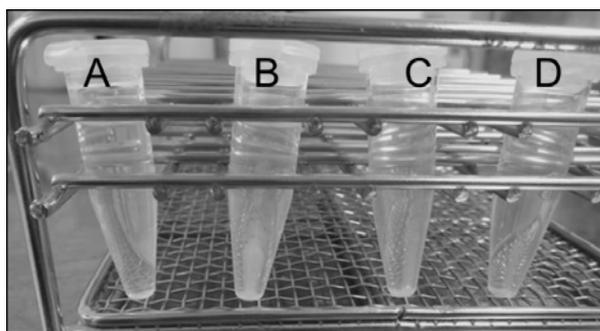


図6 パンソルビンのロット差の比較

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

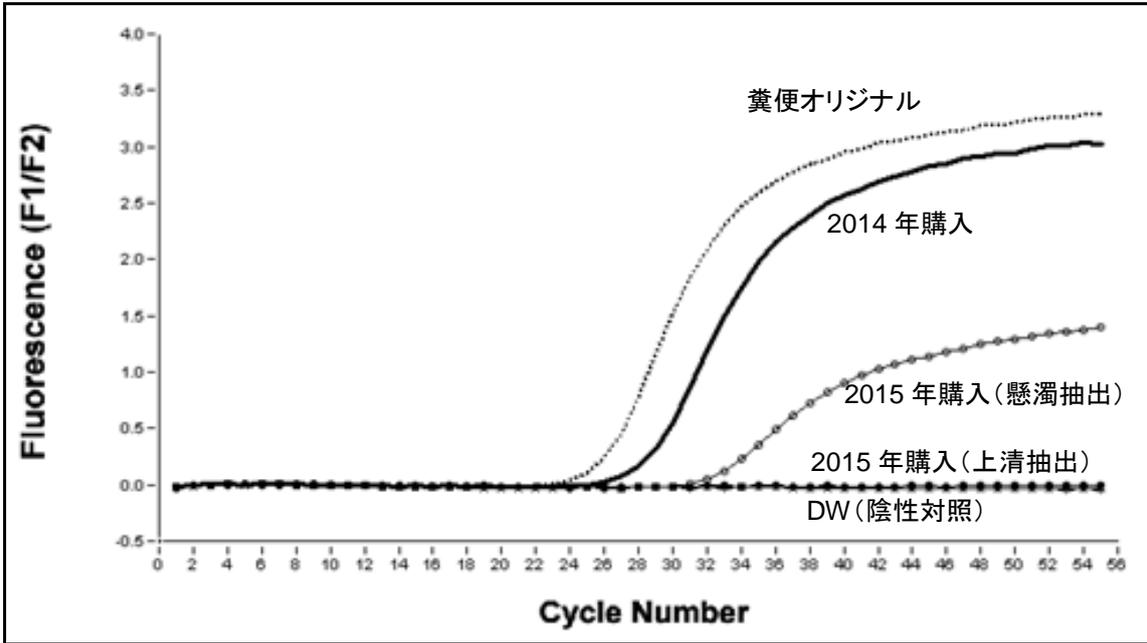


図7 白濁による回収率の低下(増幅曲線)

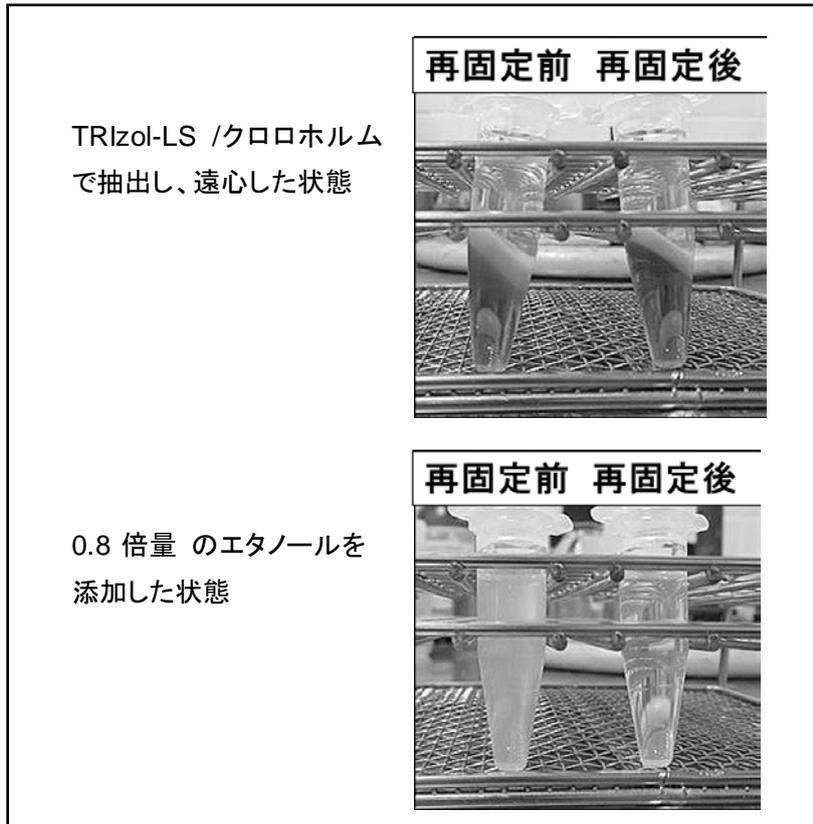


図8 パンソルビン再固定の効果(抽出操作時の観察)

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 ⁴	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 ³	0.68
2015 年購入 (再固定後)	4.49×10 ⁴	30.4

投入量： 1.45×10⁵ 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 ⁷	9.35×10 ⁶	33.4
CA6	9.12×10 ⁷	6.86×10 ⁶	7.5
CA16	1.45×10 ⁸	2.77×10 ⁷	19.2
Echo-9(Hill 株)	6.01×10 ⁷	6.14×10 ⁶	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 9.16×10⁵ copies /10g、CA2 1.13×10⁷ 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 9.16×10^5 copies /10g、 CA2 1.13×10^7 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

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」
総合研究分担報告書(平成 28～30 年度)

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	鈴木 達也	一般財団法人食品薬品安全センター
	中阪 聡亮	一般財団法人食品薬品安全センター
	野田 衛	国立医薬品食品衛生研究所
	上間 匡	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
		新潟県保健環境科学研究所
		富山県衛生研究所
		東京都健康安全研究センター
		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検査機関を対象として、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。これまでの結果より、検査精度に関する情報が種々得られた。平成 28 年度は検体 7 種〔高濃度検体：3 種、低濃度検体：3 種（3 種はいずれも同一濃度）および陰性検体：1 種〕、および標準 DNA 溶液を調査検体として配布し、定量検査を各検査機関にて実施した後、回収した結果の解析を行った。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、検量線の濃度範囲を 10^1 コピーまで拡張しても、相関係数は 10^3 コピー以上の濃度範囲の場合と同等であった。また、標準 DNA 溶液において 1 機関で高めの値を報告したが、その他の検査試料では全ての検査機関で正しく検査が実施されているものと考えられた。これらの結果のばらつきは非常に小さいものであった。よって、平成 29

年度より、より実際の食品検体に近づけるためきな粉を基材として食品検体を作製した。すなわち、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、標準 DNA 溶液では実測値における変動係数が 0.009 と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。これに対して、ウイルス懸濁液では変動係数が約 0.1 であった。さらに今回初めてきな粉を基材とした食品検体を採用し、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 0.3~0.4 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 0.2~0.3 となった。平成 30 年度は、平成 29 年度と同様の検体を用い、その再現性について検討した。その結果、標準 DNA 溶液はやや変動係数が大きくなったものの精度の良いことが確認された。また、ウイルス懸濁液も同様の結果が得られたが、食品検体においては、変動係数が約 0.6 と大きくなった。この原因は、新たに作製した食品検体を用いたためと実施者が 29 年度と異なっていたことが、ばらつきが大きくなった原因と考えられた。また、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推察された。

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になることから、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 GLP 制度が導入された。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. 調査検体

平成 28 年度の調査試料は検査試料（ノロウイルス GII 陽性または陰性の 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 2 濃度（各 3 本）とし、1 本については陰性とした。なお、検体-1、検体-3 および検体-6 を高濃度検体、検体-4、検体-5 および検体-7 を低濃度検体とした。また、標準 DNA 溶液については濃度未知の 1 本と濃度既知 2 本（ 10^1 コピーおよび 10^2 コピー）の合計 3 本とした。このうち濃度既知の標準 DNA 溶液については、検量線の相関性確認に使用した。平成 29、30 年度の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 10 機関（平成 29、30 年度は 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検体の発送を行った。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。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。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。さらに、各検体および検査方法間の平均値の群間比較は Tukey-Kramer の HSD 検定により行い、 $p < 0.05$ のとき有意差ありとした。

（倫理面への配慮）

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

C. 研究結果

1. 平成 28 年度の外部精度管理調査結果

10 機関を対象として、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〔高濃度検体：3 種、低濃度検体：3 種（3 種はいずれも同一濃度）および陰性検体：1 種〕、および標準 DNA 溶

液を調査検体として配布し、定量検査を各検査機関にて実施した後、回収した結果の解析を行った。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、検量線の濃度範囲を 10^4 コピーまで拡張しても、相関係数は 10^3 コピー以上の濃度範囲の場合と同等であった。また、標準DNA溶液において1機関で高めの値を報告したが、その他の検査試料では全ての検査機関で正しく検査が実施されているものと考えられた。これらの結果のばらつきは非常に小さいものであった。標準DNA溶液および検査試料のCt値について観察した結果、1機関を除いて標準DNA溶液ではほぼ2サイクルの範囲に、検査試料ではほぼ3サイクルの範囲にあった(図1)。さらに検査試料は高濃度検体、低濃度検体のいずれも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、高濃度検体および低濃度検体のいずれにおいても有意差は認められなかった(図2)。

2. 平成29年度の外部精度管理調査結果

9機関を対象として、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。今年度は食品検体としてきな粉を基材として用いた。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1機関において2回の測定でばらつきが認められたが、測定傾向は同じであった。一方、標準DNA溶液では実測値における変動係数が0.009と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。これに対して、ウイルス懸濁液では変動係数が約0.1であった。さらに今回初めてきな粉を基材とした食品検体を採用し、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0.3~0.4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0.2~0.3となった(表1)。

3. 平成30年度の外部精度管理調査結果

平成29年度に引き続き、同様の検体を用いて9機関を対象として、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。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。

4. 参加機関の評価方法の検討

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、平成 28 年度は得られた平均値および標準偏差を用いた z-スコアによる評価を行った。また、これと並行して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、Xbar-R 管理図を参考とした評価を行うこととした。Xbar-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、実数測定の場合、標準 DNA 溶液では z-スコア、Xbar-R 管理図を参考とした評価のいずれにおいても検査機関の評価を行うことは可能であったが、検査試料においては z-スコアによる評価は見かけ上可能であるものの、Xbar-R 管理図を参考とした評価では Xbar 管理図の下部管理限界線の値がマイナスの値となった。これに対し、対数解析では Xbar-R 管理図を参考とした評価においても上部、下部管理限界線のいずれもプラスの値として設定することができた (図 3)。以上のことから、対数解析による参加機関の評価を行ったところ、標準 DNA 溶液において 1 機関で z-スコアが 2 以上の値を示した機関が認められたが、それ以外の検査試料ではいずれも正しく検査が実施さ

れているものと判断した。また、R 管理図においても全ての調査試料で管理限界線を超える機関は認められなかった。一方、平成 29 年度および 30 年度は標準 DNA 溶液の他、ウイルス懸濁液と食品検体を用いて同様の評価を行った。その結果、変動係数の小さい標準 DNA 溶液やウイルス懸濁液 (図 4) においては、評価が可能であったが、平成 30 年度の食品検体では、変動係数が大きく、Xbar-R 管理図を参考とした評価では Xbar 管理図の下部管理限界線の値がマイナスの値となった (図 5)。

D. 考察

検量線の作成において標準 DNA 溶液として配布した試料を検量点として加えた場合の相関係数について観察したところ、 10^1 コピー以上の濃度範囲においても 10^3 コピー以上での検量線とほぼ同等の相関係数が得られたことは、低濃度域での定量性の確保という意味でも大きいものと考えられる。また、高濃度検体および低濃度検体の変動係数は 5~10%であり、非常にばらつきの小さな結果が得られた。一方、標準 DNA 溶液については 10^5 コピーの未知試料については変動係数が 1.3%と非常に小さかったが、 10^2 コピーでは 5%、 10^1 コピーでは 13%であった。このことは標準 DNA 溶液でもより低濃度となることによりばらつきの要因が増える可能性を示唆した。さらに、標準 DNA 溶液と検査試料における変動係数を比較すると、検査試料のほうが大きい傾向にあることから、リアルタイム PCR による測定のみならず抽出工程を含むことでばらつきが大きくなることが示唆された。これらの結

果を用いて参加機関の評価を行った。このとき、実数解析を行った場合、zスコアによる評価においては見かけ上、評価を行うことは可能であったが、Xbar-R 管理図を参考とした評価において、変動係数が0.5を超えていることから Xbar 管理図の下部管理限界線の値がマイナスの値となった。このことは、検出限界未満であったとしても定量可能な濃度で検出できれば、評価を行ううえでは許容範囲内であると判断される可能性を含んでいる。そのため、実数解析はノロウイルス検査の外部精度管理調査を行ううえでは参加機関の評価方法としては適していないものと考えられた。一方、対数解析の場合には実数解析で認められたような傾向はなかった。以上のことから、参加機関の評価を行ううえでは、対数解析によって得られた基本統計量を採用することが適切であると判断した。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高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 0.2 と非常に小さく、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、平成 29 年度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。当初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思っていたが、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、平成 30 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。平成 29 年度と同様の検体を用いたのにも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、平成 29 年度に作製した検体と同様に作製したものであるが平成 30 年度に新たに作製されたものであり、ロットの違うものと判明した。よって、ロット間差も確認されておらず、検体の問題であることが確認された。さらに、平成 29 年度の測定の実施者は平成 30 年度では 4 機関で同一実施者であったが、他の 5 機関は実施者が異なっていた。これらのことから、平成 29 年度と平成 30

年度の結果の違いは、検体の問題と実施者が異なっていたことが原因と考えられ、平成 30 年度の結果は平成 29 年度の結果と近いものになると推測された。本研究期間において評価法として従来法とロバースト法を検討したが、これらの参加機関からの合意値を用いることは、9 機関とあまりに少ないことより正しく評価するためには付与値をあらかじめ決めてから評価すべきであると思われた。そうすることで、参加機関の測定値に左右されない評価が可能となると考えられた。

E. 結論

ノロウイルス検査の外部精度管理調査を行うことを目的として、各検査機関の現状と検査精度について、種々の検体を用いて検討した。そこで、平成 29、30 年度はノロウイルス 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実施した。その結果、標準 DNA 溶液では実測値において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、変動係数は平成 29 年度よりもやや高くなり、ウイルス懸濁液と比較しても約 4 倍であった。しかし、これは検体の問題と測定の実施者が異なることがわかり、この 2 年間の結果はほぼ同等と考えられた。今後の展開として、参加機関を増やして、評価を行い、食品検体の基材の検討が必要となると考えられた。

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

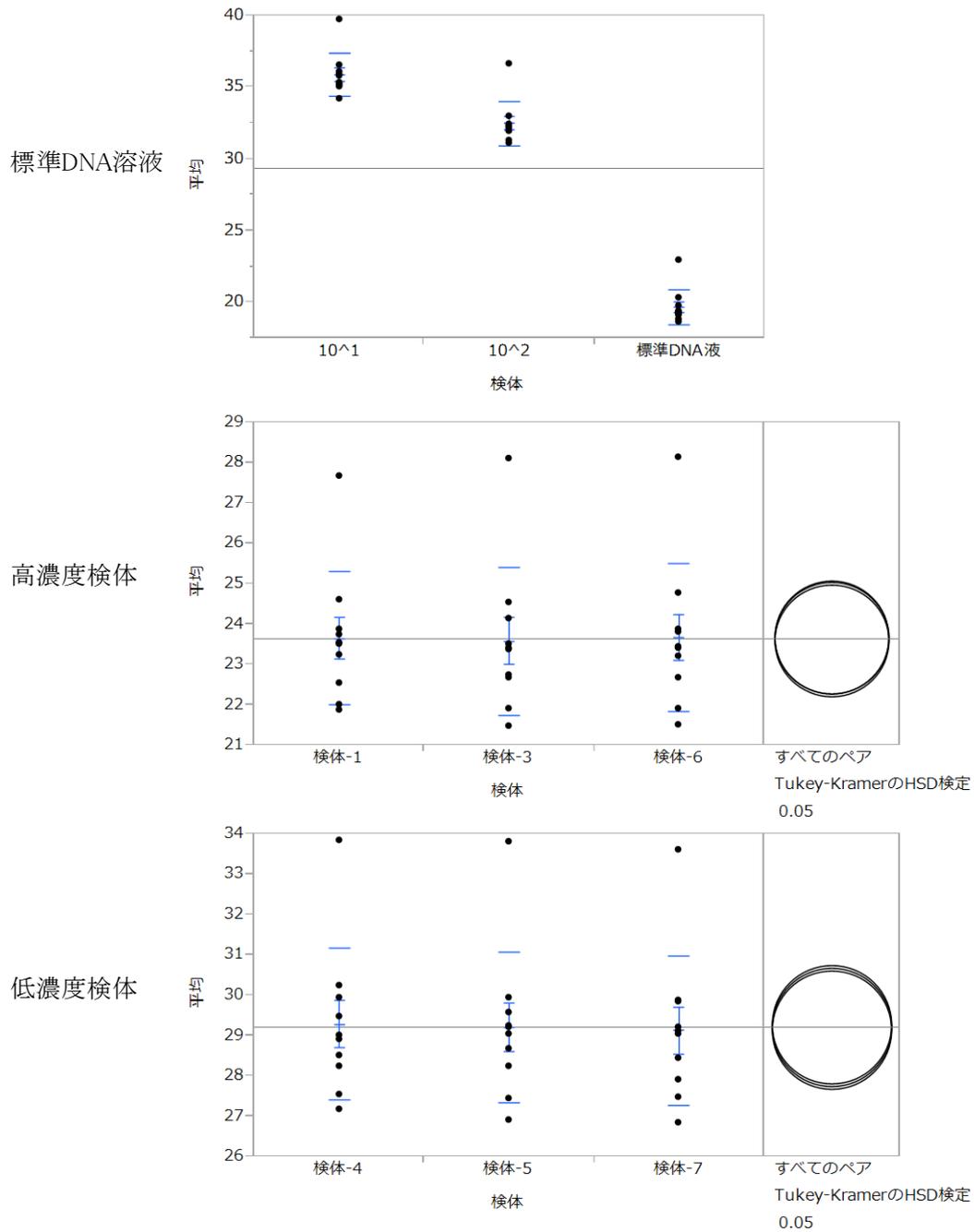


図1 調査試料における Ct 値

高濃度検体および低濃度検体における平均値の群間比較は Tukey-Kramer の HSD 検定により行った。

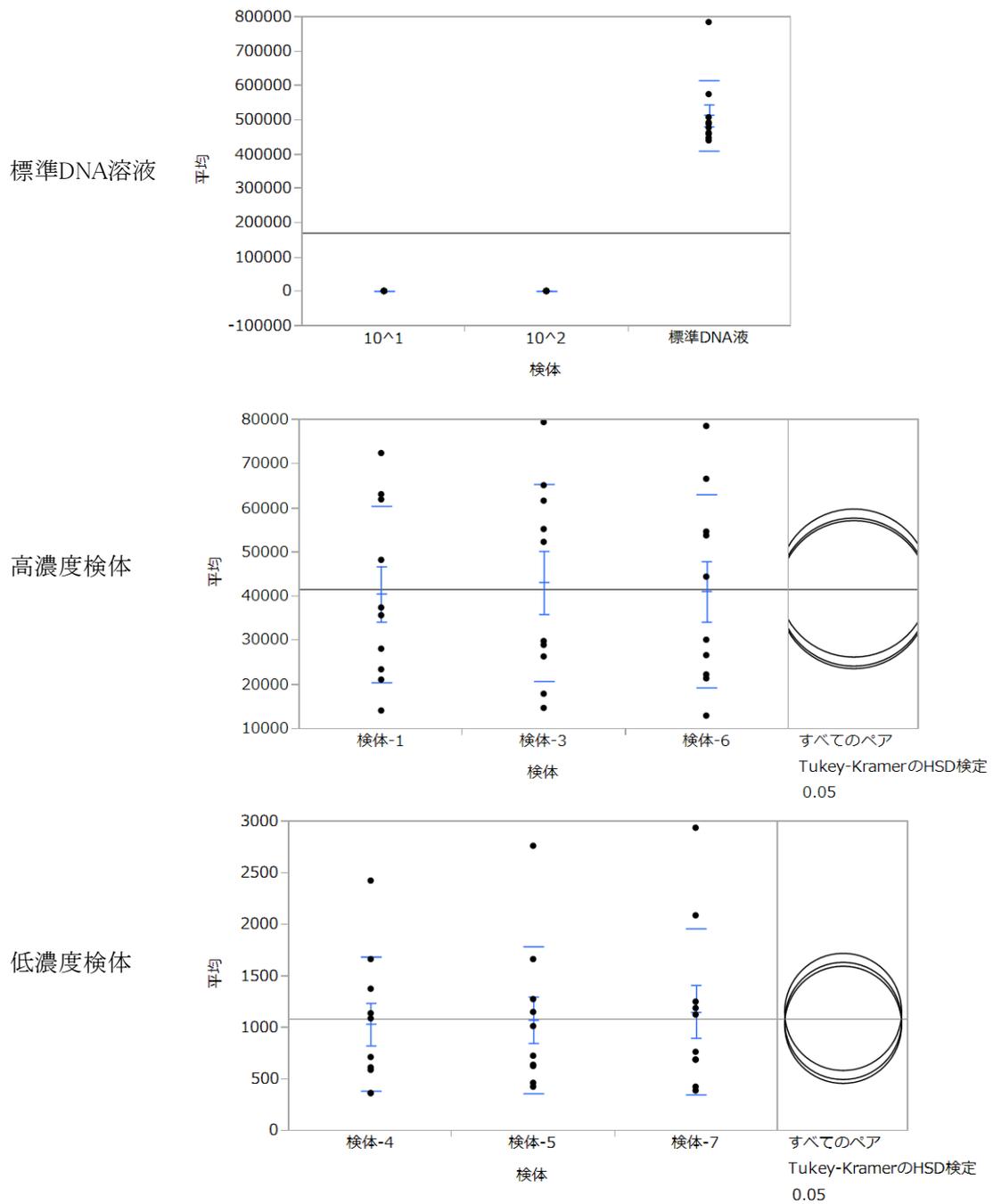


図 2 調査試料における実測値（実測値、実数解析）

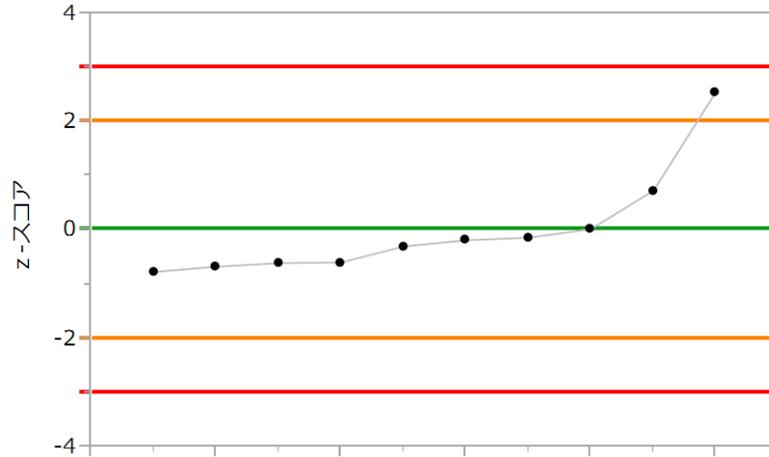
高濃度検体および低濃度検体における平均値の群間比較は Tukey-Kramer の HSD 検定により行った。

表1 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	2.475482	± 0.313232	0.126534	2.478737	± 0.348253	0.140496	
	検体-6	2.471287	± 0.285914	0.115694	2.476259	± 0.313609	0.126646	
	検体-7	2.468499	± 0.285194	0.115533	2.478380	± 0.301925	0.121824	
食品検体	検体-1	1.039332	± 0.315435	0.303498	0.997391	± 0.253086	0.253748	
	検体-2	1.057942	± 0.419815	0.396822	1.042132	± 0.205603	0.197291	
標準DNA液	検体-4	0.949282	± 0.371412	0.391255	0.950919	± 0.308734	0.324670	
		5.705551	± 0.049595	0.008692	5.700587	± 0.030855	0.005413	

単位: log(コピー)

1) Z-スコア



2) Xbar-R管理図を参考とした評価

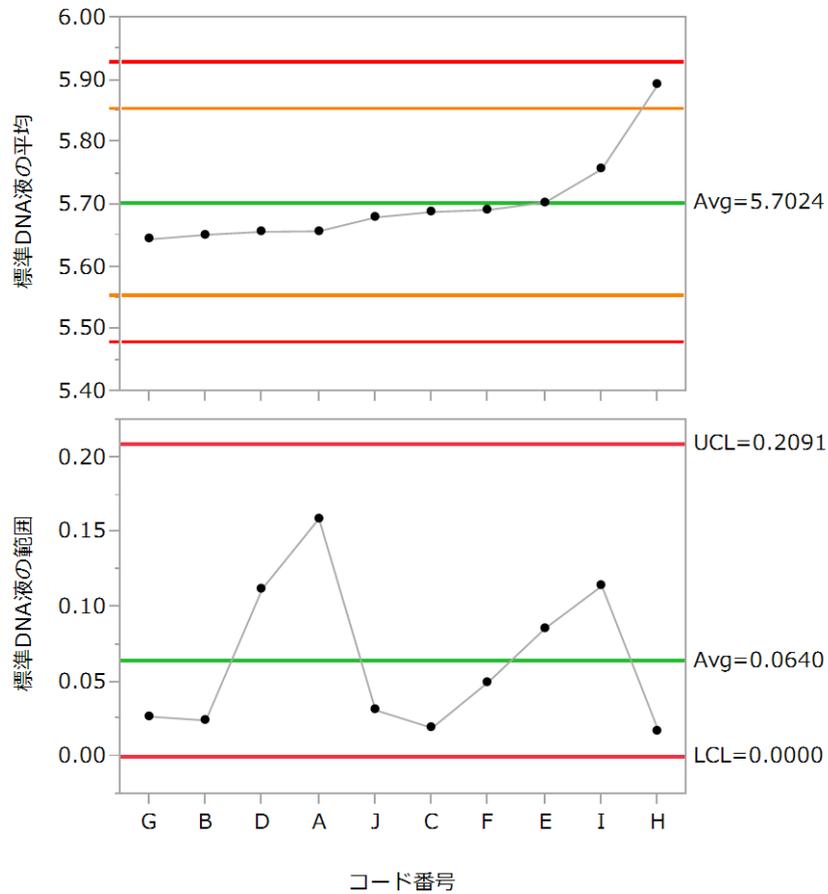


図3 標準DNA溶液（未知試料）における参加機関の評価（実測値、対数解析）
 Xbar-R管理図を参考とした評価では、管理限界線の値を|z-スコア|=2および3とした。

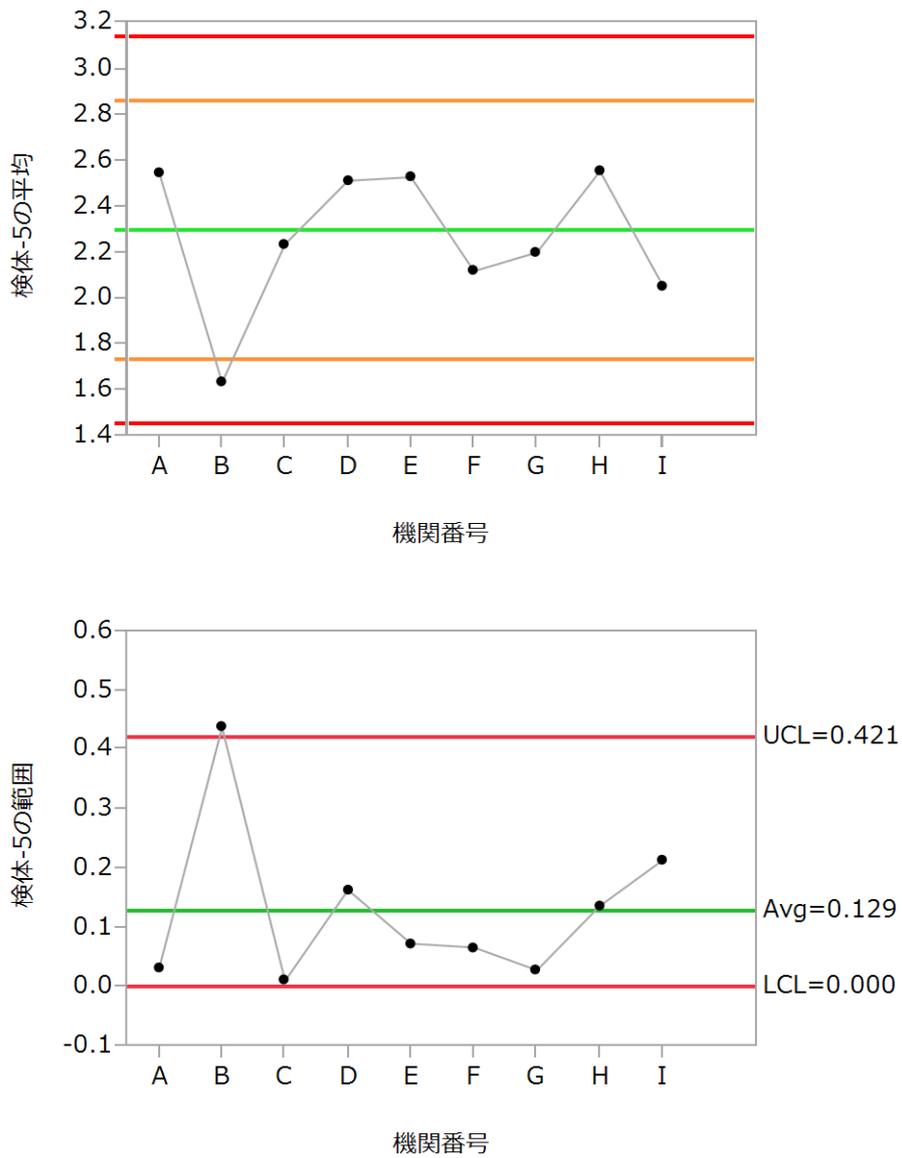


図4 検体-5 (ウイルス懸濁液) における Xbar-R 管理図による評価 (実測値)
 Xbar 管理図における管理限界線は|z-スコア|=2 および 3 とした。

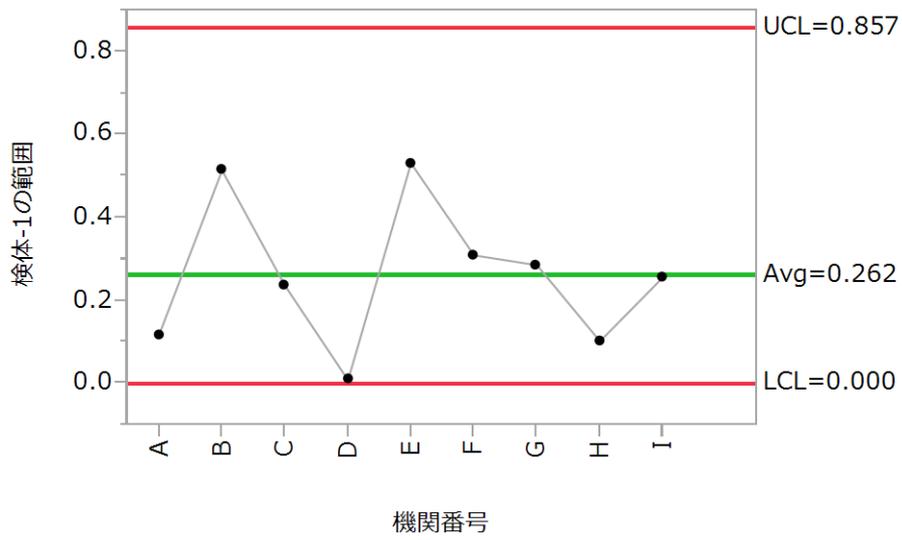
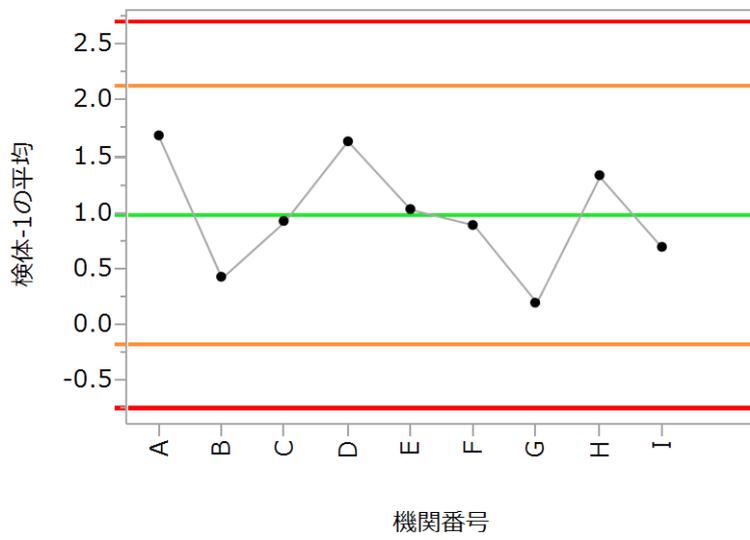


図5 検体-1（食品検体）における Xbar-R 管理図による評価（実測値）
 Xbar 管理図における管理限界線は $|z\text{-スコア}|=2$ および 3 とした。

富山県におけるノロウイルス・サポウイルス検出状況及び メタゲノム解析による下水からのノロウイルス・サポウイルスの検出

研究分担者	滝澤 剛則	富山県衛生研究所
研究協力者	稲崎 倫子	富山県衛生研究所
研究協力者	名古屋 真弓	富山県衛生研究所
研究協力者	板持 雅恵	富山県衛生研究所

研究要旨

富山県におけるノロウイルス (NoV)、サポウイルス (SaV) の浸淫状況を調査するため、2016 年の感染性胃腸炎患者、下水流入水からウイルスを検出した。患者からは NoV GII. 4、GII. 17、GII. 2、SaV GI. 1 などが検出された。下水からは NoV GII. 4、GII. 17、GI. 6 などが検出された。1 月～8 月には集団発生事例、小児散発例、下水からは NoV GII. 4 が、集団発生事例と下水流から NoV GII. 17 が共通して検出された。11 月～12 月には NoV GII. 2 が主流であった。2011 年から 2013 年に採取した下水流入水について次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析を行い、NoV と SaV の検出を試みたところ、NoV GI、GII、GIV、SaV GI、GII、GIV、GV の配列が得られた。ダイレクトシーケンス法では検出されなかった遺伝子群や遺伝子型についても検出された一方で、ダイレクトシーケンス法よりも検出感度が低い場合もあった。メタゲノム解析は、下水検体に含まれる複数種類の NoV、SaV を幅広く検出するには有用であった。

A. 研究目的

2016 年の 1 年間に、胃腸炎患者や下水流入水からノロウイルス (NoV)・サポウイルス (SaV) を検出し、患者での流行型、不顕性感染を含めた地域の流行状況を把握することを目的とした。

また、下水流入水には、流入域に存在する患者から排泄された複数の遺伝子群

や遺伝子型の NoV、SaV が含まれると考えられる。しかしながら、PCR 産物のダイレクトシーケンス法 (常法) による解析では、多数を占める種類しか検出できない。そこで、次世代シーケンサー (NGS) を用いたメタゲノム解析によりウイルスを網羅的に検出することで、下水に存在する複数種類の NoV、SaV を明らかにでき

るか検討した。

B. 研究方法

1. 2016年の患者検体

富山県において2016年1月から12月に発生した食中毒、感染性胃腸炎（集団発生例及び小児散発例）から得られた糞便を用いた。検体採取は管轄の厚生センター、保健所が行った。

糞便検体の10%乳剤上清から、厚生労働省通知（食安監発1105001号）に基づきRNAを抽出し、DNase処理、逆転写反応及びPCRを行った。NoVの検出には、リアルタイムPCRを用い、PCRには、ポリメラーゼ領域3'末端からカプシド領域を対象としたG1-SKF/G1-SKR、G2-SKF/G2-SKRもしくはORF1/ORF2ジャンクション領域を対象としたプライマー1421f/G1-SKR及び1364f/G1-SKR（GI用）、1421f/NV2oR及び1364f/G2-SKR（GII用）（Nakamura et al., Jpn. J. Infect. Dis., 62: 394-398, 2009）を用いたnested PCRを行った。SaVの検出には、カプシド領域を対象としたプライマーSV-F11/SV-R1及びSV-F2/SV-R2によるnested-PCR（Okada et al., Arch. Virol., 147: 1445-1451, 2002）を用いた。PCR産物から、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定した。NoVの型別判定にはカプシド領域を対象としたG1-SKF/G1-SKR、G2-SKF/G2-SKRの部分を用いて、Norovirus Genotyping Tool（URL: <http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool>）及び基準配列を用いた近接接合法による系統樹解析により行い、遺伝子型番号は、新しい遺伝子型分類法（国立感染症研究所、IASR病原

微生物検出情報、35(7), 173-175, 2014)により表記した。SaVの型別判定には基準配列を用いた近接接合法による系統樹解析を行った。

2. 下水流入水

県西部に位置する下水処理場において、2016年1月から12月の毎月1回下水流入水1リットルを採取した。

下水流入水を3,000rpmで30分遠心して得られた上清に、最終濃度0.05Mになるように塩化マグネシウムを添加し、0.5規定の塩酸を用いてpH3.5に調整した。この液を陰電荷膜にろ過した後、細切した陰電荷膜を3%beef extract液10mlに浸漬し、Vortex処理により吸着分子を溶出した。溶出液を遠心し、回収した上清を100倍濃縮下水検体とした。濃縮下水検体から、患者検体と同様にRNA抽出、DNase処理、逆転写反応、PCR法及びダイレクトシーケンス法による塩基配列の決定を行った。PCR法におけるプライマーは、NoV GIの検出にはG1-SKF/G1SKR、NoV GIIの検出にはG2SKF/G2SKR、SaVの検出にはSV-F11/SV-R1を用いた。

3. メタゲノム解析による下水からのNoV・SaVの検出

2011年1月から2013年12月に、研究方法2と同様に得た下水流入水の100倍濃縮液から、キャリアフリーの抽出液を用いてRNA抽出を行い、ScriptSeq v2 RNA-Seq Library Preparation kit(Epicentre)を用いてRNA-Seqライブラリを作製した。この検体を、NGS（MiSeq;Illumina）を用いて、MiSeq Reagent Kit v3 (150 cycle)により塩基配列を解読した。

解読結果は、国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センターの Metagenomic Pathogen Identification for Clinical specimens (MePIC) ソフト (Takeuchi, F., et al. Jpn. J. Infect. Dis., 2014, 67:62) によりヒト遺伝子配列を除いて megablast 解析を行った。MePIC により分類された塩基配列は MEtaGenome Analyzer (MEGAN) 5 (Universität Tübingen) により閲覧を行い、NoV 及び SaV の配列を抽出した。得られた基準配列を元に Norovirus Genotyping Tool (<http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool>) により NoV 遺伝子型 (ORF2) 及び SaV 遺伝子群の推定を行った。

同一の下水検体について、常法として 2016 年の下水検体と同様に RNA 抽出、DNase 処理、逆転写反応、PCR 法及びダイレクトシーケンス法による塩基配列の決定を行った。

(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、倫理面への配慮は不要である。

C. 研究結果

1. 患者からの NoV、SaV 検出状況

ウイルス性感染性胃腸炎及び食中毒等の集団発生は 20 事例あり (表 1)、事例数としては 2015 年の 19 事例と同程度であり、2014 年の 13 事例と比較してやや多かった。20 事例全てから NoV が検出された。うち食中毒事例は 5 事例であり、2015 年の 2 事例より多かった。

小児散発例として検査を実施した 18 例中 7 例から NoV が、4 例から SaV が検出さ

れた。(表 2)

2. 患者、下水流入水から検出された NoV 及び SaV の遺伝子型

集団発生の患者から検出されたウイルスは NoV GII. 17、GII. 2、GII. 4 の順に多かった (表 1)。散発例の患者では SaV GI. 1、NoV GII. 4 の順に多かった (表 2)。下水流入水からは、NoV については患者から検出された遺伝子型が GII. 6 を除いて検出されたほか、患者から検出されなかった GI. 2 も検出された。SaV は下水流入水からは検出されなかった (表 3)。

2015/16 シーズンにあたる 1 月～8 月には、NoV GII. 4 が集団発生、散発例、下水から、GII. 17 が集団発生、下水から多く検出される傾向にあった。GII. 2 は、11 月～12 月に集団発生・散発例・下水の全てから最も多く検出された。

3. 検出された NoV 及び SaV の比較

検出された NoV 及び SaV の塩基配列を用いた系統樹を図 1～3 に示す。NoV GI については、集団発生事例と下水から検出された株のうち、4 月の下水と 5 月の集団発生事例から検出された GI. 3 株が互いに近縁であった (相同性 100%)。NoV GII については、検出された GII. 4 株の亜型は、患者と下水ともに Sydney_2012 亜型 (Sydney/NSW0514/2012/AU と近縁) が主流であった。特に 1 月と 3 月の小児散発例、4 月と 6 月の集団発生事例、7 月の下水から検出された株が互いに近縁であった (相同性 99.7～100%)。集団発生事例 6 事例から検出された GII. 17 株はいずれも、2014/15 シーズンに国内で検出された Kawasaki308/2015/JP 株に近縁であった。SaV については、散発例から検出さ

れた GII. 1 株のうち、6 月から 12 月に検出された 3 株が互いに近縁であった（相同性 99.7～100%）。

4. メタゲノム解析による下水からの NoV・SaV の検出

各検体のメタゲノム解析により検出された NoV 及び SaV のリード数を、推定遺伝子型及び遺伝子群別に表 4 に示す。3 年間の 36 検体のうち、25 検体から NoV の配列（最大 107 リード）が、24 検体から SaV の配列（最大 57 リード）が検出された。

NoV は GI、GII、GIV の 3 つの遺伝子群に分けられ、GI と GII はさらにそれぞれ 8 種類と 10 種類の遺伝子型に分けられた。得られたリードが多い順に、GI では GI. 6、GI. 4、GII では GII. 4、GII. 14 であり、常法で最も多く検出された GI. 4、GII. 4 と概ね一致していた。SaV は、常法では GI のみが検出されたのに対し、メタゲノム解析では GI、GII、GIV、GV の 4 つの遺伝子群が得られ、GI のリード数が最も多かった（図 4）。

メタゲノム解析により、常法では検出されなかった NoV の遺伝子型（GI. 8、GI. 9、GII. 6、GII. 7、GII. 13、GII. 16、GII. 22、GIV）及び SaV の遺伝子群（GII、GIV、GV）が得られた一方、常法では各 1 検体より検出された NoV GI. 2、GII. 17 についてはメタゲノム解析では検出されなかった（図 4）。NoV GI については、2011 年は常法で検出された GI. 2、GI. 4 がメタゲノム法では検出されなかった（表 4-A）。また、2012 年においては、常法では GI. 1、GI. 3、GI. 4、GI. 6 が検出されたのに対し、メタゲノム解析では GI のリードは検出されな

かった（表 4-B）。

D. 考察

2015/16 シーズンにあたる 1 月～8 月には NoV GII. 4 が小児散発例、集団事例、下水から検出されており、2015 年までと同様にこの型が流行していたと考えられた。GII. 4 の亜型は 2015 年に引き続き Sydney_2012 亜型が中心であったと考えられた。NoV GII. 17 は特に 3 月に集団発生事例から最も多く検出され、この傾向は 3 月～5 月に集団発生から GII. 17 が検出された 2015 年と同様であった。GII. 17 の検出株は 2015 年と同様に Kawasaki308/2015/JP 近縁株が最も多く、2014/15 シーズンと 2015/16 シーズンともにこのタイプが県内における流行の中心であったと推定された。2016/17 シーズンにあたる 11 月～12 月は GII. 2 が集団発生、散発例、下水の全てにおいて検出数が最も多かったことから、この期間は GII. 2 が流行の中心であったと考えられた。

NoV GI については、集団発生事例と下水から遺伝子型 GI. 3、GI. 4、GI. 6 が共通して検出された。例年 NoV GI は下水からは高い頻度で検出されるものの、患者からの検出数は少ない傾向にあった。本研究において、複数の遺伝子型が患者と下水の両方から検出されたことにより、下水から検出される NoV GI の遺伝子型が患者の発生と関連していることが改めて示唆された。

集団発生事例と小児散発例の患者から検出された NoV の遺伝子型は、GII. 6 を除いて下水からも検出された。また、一部

の遺伝子型においては、患者と下水から近縁な株が検出された。このことから、下水中には NoV の患者発生状況が反映されていると考えられる。

SaV については、散发例から検出された株はいずれも GI.1 であり、この遺伝子型が小児で流行していたと考えられた。

下水中の NoV 及び SaV の遺伝子群及び遺伝子型の検出法としてもメタゲノム法を検討した。その結果、多数を占める遺伝子型のみ検出されると考えられる常法と比較して、より多くの種類の遺伝子型が検出された。NoV GI、GII、SaV それぞれにおいてメタゲノム解析により最も多くリードが得られた遺伝子群、遺伝子型は、概ね常法で検出率の高い遺伝子群、遺伝子型に対応しており、検体中のウイルス量が常法及びメタゲノム解析の結果に反映されていると考えられた。これに加えて、メタゲノム解析では、常法では検出されなかった遺伝子群及び遺伝子型の配列も検出された。これより、メタゲノム解析は下水検体に含まれる複数種類の NoV、SaV を幅広く検出するには有用であると考えられた。さらに、メタゲノム解析でのみ検出された NoV GIV と SaV GV は、常法で用いるプライマーの結合部位に塩基配列のミスマッチが存在しており、PCR 法で検出されにくい可能性があることから、従来の検出法で検出感度が低い遺伝子型の検出においても、プライマーに依存しないメタゲノム解析は有用であると考えられた。

その一方で、NoV GI については、常法よりも検出率が低い場合があった。この原因として、検査対象とした下水検体で

は NoV GI のウイルス量が NoV GII や SaV と比較して少なく、メタゲノム解析における検出率が低くなった可能性が考えられる。このように、検体中の存在比が低いと考えられる特定のウイルスを検出する場合には、特異的プライマーを用いたダイレクトシーケンス法や、NGS を用いたディープシーケンス法の併用も考慮する必要があると考えられた。

E. 結論

2016 年のノロウイルスは、2015/16 シーズンにあたる 1 月～8 月には、例年流行している GII.4 のほか、2015 年と同様に集団発生を中心に GII.17 の流行がみられた。GII.4 の亜型は Sydney 2012 が主流であった。2016/17 シーズンにあたる 11 月～12 月には、患者及び下水からの検出株は GII.2 が主流であった。

メタゲノム解析により下水流入水から NoV 及び SaV のリードを検出し、遺伝子群及び遺伝子型の推定を行ったところ、常法で検出された多数を占める遺伝子以外の遺伝子群、遺伝子型も検出できた。常法では検出されにくい可能性がある遺伝子型も検出された一方で、常法よりも検出率が低い場合もあった。メタゲノム解析は、下水検体に含まれる複数種類の NoV、SaV を幅広く検出するには有用であった。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

名古屋真弓、板持雅恵、稲崎倫子、稲畑良、佐賀由美子、米田哲也、野田衛、

滝澤剛則、小渕正次：メタゲノム解析による下水からのノロウイルス・サポウイルス検索. 第64回日本ウイルス学会学術集会, 札幌市, 平成28年10月24日

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. 集団発生事例からのノロウイルス及びサポウイルス検出状況

ウイルス		2016年												計
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
NoV	GI.3					1								1
	GI.4									1 ^b				1
	GI.6					1								1
	GII.2											2	3	5
	GII.3				1									1
	GII.4	2	1		1		1							5
	GII.6						1 ^a					1		2
	GII.17			4			1 ^a				1 ^b			6
合計		2	1	4	2	2	3	0	0	2	0	3	3	22

(数値：のべ事例数)

a, b：それぞれ同一事例

表 2. 小児散発例からのノロウイルス及びサポウイルス検出状況

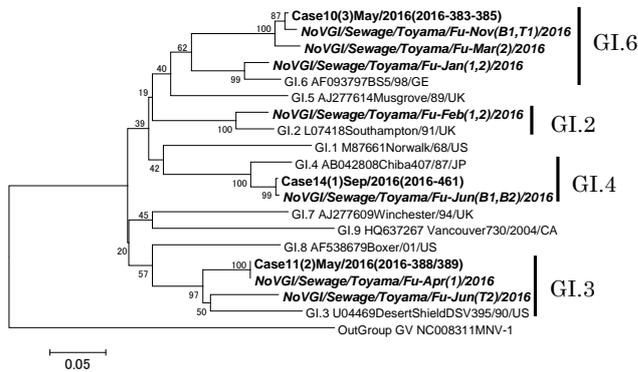
ウイルス		2016年												計
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
NoV	GII.2												2	2
	GII.3				1		1							2
	GII.4	1		1		1								3
SaV	GI.1	1					1					1	1	4
合計		2	0	1	1	1	2	0	0	0	0	1	3	11

表 3. 下水流入水におけるノロウイルス及びサポウイルス検出状況

ウイルス		2016年												計
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
NoV	GI.2													1
	GI.3													2
	GI.4													1
	GI.6													3
	GII.2													1
	GII.3													1
	GII.4													3
	GII.17													3

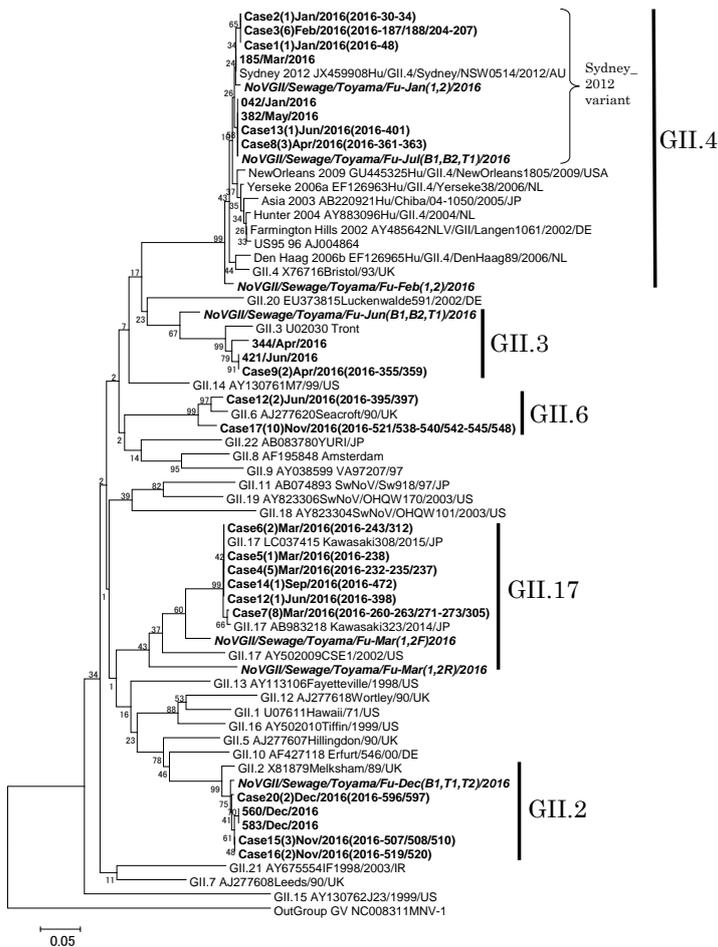
サポウイルスは非検出

図 1. ノロウイルス GI の系統樹



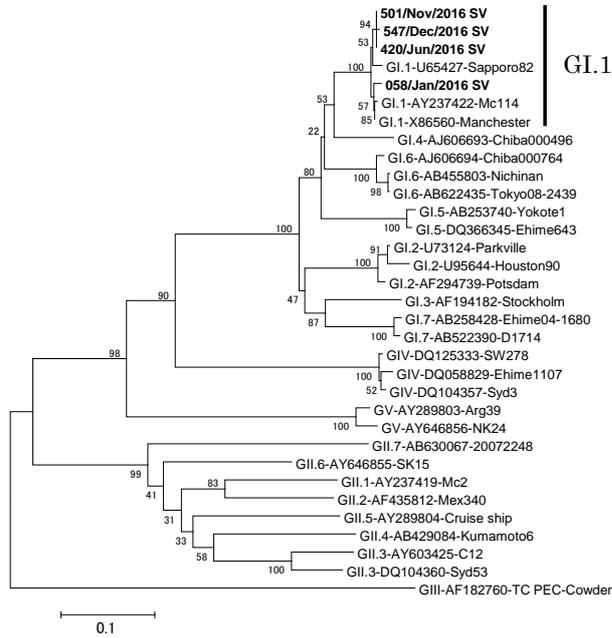
太字のうち斜体は下水流入水から、それ以外は患者から検出されたウイルスを示す。その他の場合は参考株（型別 accession no./株名）を示す。

図 2. ノロウイルス GII の系統樹



株名については図 1 と同じ。GII.4 参考株については（亜型 accession no./株名）で示す。

図 3. サポウイルスの系統樹



株名については図 1 と同じ。

表 4. 下水流入水からメタゲノム解析により得られたノロウイルス及びサポウイルスのリード数

A. 2011 年

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
総リード数	2,360,642	3,076,464	2,524,770	4,103,576	2,941,728	2,868,358	2,409,804	2,441,216	3,069,784	2,651,710	2,260,094	2,575,002
Norovirus リード数	20	16	21	24	14	4	1	0	2	0	10	3
Sapovirus リード数	8	9	6	22	38	50	0	0	0	0	2	1
NoV GI	GI.1		2	2								
	GI.2											
	GI.4											
	GI.7			10	2							1
	GI.8								2			
	GI.9							1				
	GI不明				2	2						
NoV GII	GI.2		4		3	4						
	GI.3		3		3	1	2					
	GI.4	18	5	4	4	4	2					2
	GI.6			2								
	GI.7				1							
	GI.12	2	2	1	4							
	GI.13		2									
	GI.14			2	3	2						
GI.16					1							
NoV GIV											10	
SaV GI	2	6		2	14	33						
SaV GII	2	3	4	4	6	2						
SaV GIV			2	14	6	4						1
SaV GV	4			2	12	11					2	

網掛けで示した遺伝子型または遺伝子群：常法で得られた遺伝子型または遺伝子群

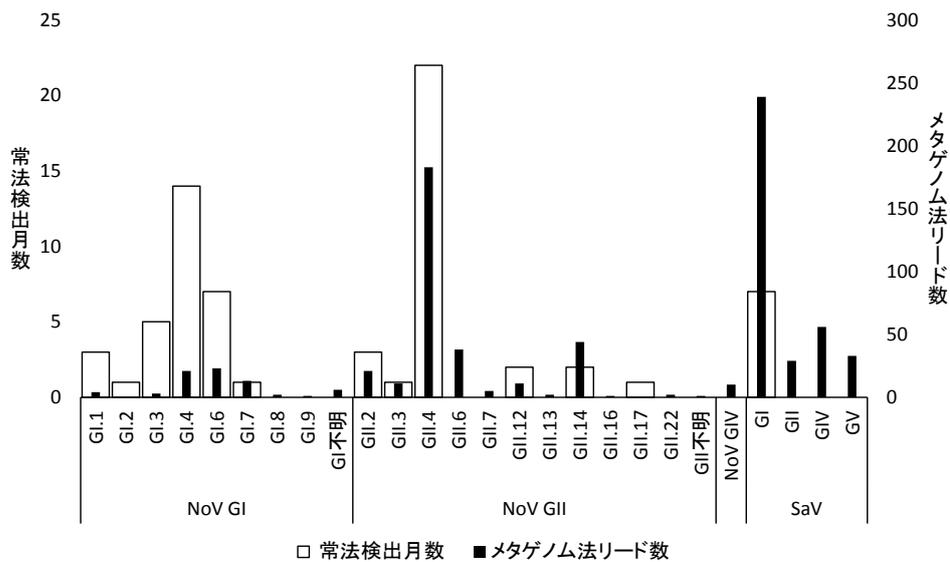
B. 2012 年

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
総リード数	1,001,086	1,342,590	1,803,852	1,185,640	1,353,902	1,804,918	1,497,468	4,050,046	1,242,226	1,544,364	2,070,858	1,774,586
Norovirus リード数	2	4	17	0	2	0	0	0	0	0	2	4
Sapovirus リード数	0	6	0	10	2	0	2	0	0	0	2	0
NoV GI												
GI.1												
GI.3												
GI.4												
GI.6												
NoV GII												4
GII.2												
GII.3			2									
GII.4		2	2	4	2						2	
GII.12												
GII.14				13								
GII.17												
SaV GI			6	10	2							
SaV GII								2				
SaV GIV												2

C. 2013 年

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
総リード数	4,172,478	3,982,550	3,798,780	5,670,066	3,847,610	3,360,356	3,725,864	4,630,814	3,286,584	4,115,612	3,703,622	4,216,554
Norovirus リード数	45	3	36	23	22	12	0	2	0	0	6	107
Sapovirus リード数	19	19	25	56	16	2	22	0	4	1	2	33
NoV GI												
GI.3		1			2							
GI.4		2		16	1			2				
GI.6					1						3	19
GI不明											1	1
NoV GII												
GII.2		4			2							
GII.4		37	2	18	17	8						50
GII.6					2	2						32
GII.7												4
GII.12					2							
GII.14		2		6	4	10					2	
GII.22			2									
GII不明												1
SaV GI		18	19	24	43	14		6	4	1	2	33
SaV GII				1			2	3				
SaV GIV		1			13			13				
SaV GV						2						

図 4. メタゲノム法と常法におけるノロウイルス、サポウイルスの遺伝子群・遺伝子型別検出数 (2011~2013 年合計)



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」
総合研究分担報告書(平成 28～30 年度)

低温加熱によるノロウイルスの不活化

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	小菅 大嗣	麻布大学 環境保健学研究科
研究協力者	野田 衛	国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

ノロウイルス(NoV)による食中毒の予防には、本ウイルスに対する不活化法を確立することが重要である。本研究では、汚染物質存在下での低温加熱による不活化の条件を明らかにすることを目的とした。NoV GI, GII, ネコカリシウイルス(FCV)およびコクサッキーウイルス B 群 5 型(CB5)を 10% Beef extract 加 PBS(-)溶液で希釈したものを 35°C~60°Cの各温度で、1 時間~一夜加熱を行い、感染価および遺伝子定量値の測定によって評価した。感染価は FCV で、45°C 一夜、50°C 6 時間、55°C 2 時間、60°C 1 時間、CB5 で、55°C 一夜、60°C 1 時間の条件で検出限界以下となった。感染性推定法による NoV の遺伝子定量値は FCV や CB5 の定量値と類似した動きを示したことから、NoV も概ね同様に不活化されているものと推定された。そのため、60°C の場合 1 時間の加熱でノロウイルスが不活化されているものと考えられた。低温加熱はウイルスの簡便な不活化法として有用と考えられた。

A. 研究目的

ノロウイルス(NoV)の食中毒を予防するためには、NoV に汚染した食品あるいは糞便や嘔吐物によって汚染した環境中の NoV を不活化することが重要であり、その不活化法として加熱は有効な手段である。NoV 汚染のおそれのある二枚貝などの食品の場合は中心部温度が 85°C~90°C 90 秒以上、調理器具等の消毒には、85°C 1 分以上の加熱が推奨されているが、食品の低温調理の場合や、嘔吐物等で汚染された絨毯や布団などの大型なものは煮沸

消毒等での高温加熱による不活化が困難である場合がある。そこで今回、NoV 不活化に対する温度と時間の関係について把握することを目的とし、60°C 以下の低温条件で長時間加熱することによる NoV 不活化効果を検討した。

B. 研究方法

1. 材料

ウイルスは NoV GI (5.88×10^5 コピー/25 μ L) および NoV GII (1.75×10^6 コピー/25 μ L)、培養可能なネコカリシウイル

ス F9 株 (FCV) (3.16×10^8 TCID₅₀/mL) およびコクサッキーウイルス B 群 5 型 (CB5) (4.4×10^7 TCID₅₀/mL) を用いた。NoV と培養可能なウイルスを一組として、NoV GI と FCV、NoV GII と CB5 の組み合わせでウイルス液を調製した。ウイルス液は 10% Beef extract 加 PBS (-) 14.4 mL にウイルスの保存液を各 300 μ L 添加した後に、0.5mL チューブに 350 μ L ずつ分注して、試験時まで -80°C で凍結保存した。

2. 加熱方法

加熱は恒温水槽を用いて行った。各温度 (35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C) で一定時間 (0 時間 (対照), 1 時間, 2 時間, 4 時間, 6 時間, 一夜 (23 時間)) 加温後、定量試験時まで -80°C で保存した。

3. 感染価定量

加熱したウイルス液 50 μ L を 2% FCS 加 DMEM 450 μ L にて 10 倍希釈し、さらに 10^{-8} まで階段希釈した。96 穴プレートに FCV 用に CRFK 細胞または CB5 用に HEP-2 細胞を播種し、そこへ希釈液 100 μ L ずつ 4 ウェルに接種し 37°C 5% CO₂ 条件で 4~5 日程度培養後、細胞変性効果 (CPE) を指標として 50% 感染終末点法 (TCID₅₀/mL) で感染価を定量した。

4. 遺伝子定量

感染性推定遺伝子検査法 (推定法) と従来法で評価した。推定法は加熱したウイルス液 70 μ L を RNase による消化を 60 分間行い、Roche High Pure Viral RNA Kit にて核酸抽出後、Oligo d(T) プライマーで逆転写反応を行った。従来法は、加熱ウイルス液 70 μ L を RNase 処理を行わず、逆転写にはランダムプライマーを用いた。得られた cDNA からリアルタイム PCR にて

ウイルスゲノムコピー数/2.5 μ L を定量した。

(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

1. 感染価定量

対照 (0 時間) と比較して FCV は、45°C 一夜、50°C 6 時間、55°C 2 時間、60°C 1 時間で感染価が検出限界以下となり、50°C 1 時間~4 時間、55°C 1 時間では概ね 3 log₁₀ 程度の感染価減少がみられた (図 1)。CB5 では 55°C 一夜、60°C 1 時間で感染価が検出限界以下となり、55°C 6 時間では 3.37 log₁₀ の感染価減少がみられた (図 3)。

2. 遺伝子定量

対照 (0 時間) の定量値と比較して、推定法では、FCV で 50°C 一夜で 1.08 log₁₀、55°C 一夜で 1.55 log₁₀、60°C では 1.86 log₁₀ の遺伝子量の減少がみられた (図 1)。CB5 では 55°C 一夜で 4.01 log₁₀、60°C 1 時間で 3.11 log₁₀、2 時間~一夜で 4 log₁₀ 程度の遺伝子量の減少がみられた (図 3)。NoV GI は 55°C 一夜で 1.53 log₁₀ の遺伝子量の減少がみられ、一夜で検出限界以下となった (図 4)。NoV GII は 50°C、55°C の一夜加熱で 1 log₁₀ 程度、60°C 一夜で 2 log₁₀ の遺伝子量の減少がみられた (図 2)。

従来法では FCV と NoV GII では遺伝子量の大きな減少はみられなかった。CB5 では 55°C 一夜、60°C 2 時間で 1.8 log₁₀、60°C 一夜で 2 log₁₀ の遺伝子の減少がみ

られ、NoV GI では60℃ 一夜で1.17 log₁₀の遺伝子量の減少がみられた。

FCV と CB5 の遺伝子定量において推定法と従来法を比較すると、推定法は従来法より感染価の減少を反映した。また、遺伝子量の減少曲線は、FCV と NoV GII, CB5 と NoV GI が類似した動きを示した。

D. 考察

FCV および CB5 の遺伝子量と感染価定量の結果と、NoV GI, GII の遺伝子量の定量結果の関係を比較すると、FCV と NoV GII, CB5 と NoV GI の遺伝子量減少が同様な動きを示していることから、FCV または CB5 の感染価と同様に NoV においても感染性が失われている可能性が考えられた。

FCV と CB5 の感染価を比較すると、55℃の加熱で FCV は2時間で検出限界以下となったが、CB5 では検出限界以下まで一夜を要した。50℃の加熱によって FCV は一夜で検出限界以下となったが、CB5 の一夜では2.5 log₁₀程度の減少にとどまり、CB5 は FCV (F9 株) より温度抵抗性が強い傾向にあった。そのため NoV の加熱による不活化に関して安全性を担保する場合、CB5 を用いた評価を行うことが望ましいと考えられた。

以上のことから CB5 の感染価が検出限界以下に減少した 55℃ 一夜加熱および60℃ 1時間以上の加熱で NoV GI, GII が不活化できる可能性が示唆された。また50℃の加熱では CB5 の感染価減少は一夜で2.5 log₁₀の減少にとどまったことから、十分な不活化効果は期待できないことが示唆された。

NoV によって汚染された絨毯や布団等

の大型で、煮沸消毒等の高温での加熱が困難な物に対するウイルスの不活化について、電気毛布、布団乾燥機等の加熱用電気機器を活用できる可能性が考えられた。

2016年の Ettayebi らの NoV の培養に成功した論文では、60℃ 15分の加熱で NoV の不活化が可能であったと報告されている。一方、加熱による不活化は一般に有機物存在下ではウイルスに対する保護作業が認められ、清浄環境と比較して不活化はされにくいとされている。そのため、本試験では汚染環境を想定し、ウイルス液に10%Beef extract を添加した環境で不活化試験を実施したが、上記報告のようにより短時間でもウイルスが不活化される可能性がある。本試験では1時間より短い時間では検討していないことから、今後検討が必要である。

E. 結論

FCV は、45℃ 一夜、50℃ 6時間、55℃ 2時間、60℃ 1時間で感染価が検出限界以下となり、CB5 では55℃ 一夜、60℃ 1時間で感染価が検出限界以下となった。遺伝子定量の減少値が FCV と GII, CB5 と GI で似た傾向を示したことから、55℃ 一夜、60℃ 1時間で NoV も不活化できる可能性が示唆された。NoV の不活化に低温長時間加熱は有効である可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

小菅大嗣，三元昌美，上間匡，小林直樹，小西良子，野田衛：低温加熱試験によるノロウイルスの不活化，第 112 回日本食品衛生学会学術講演会，2016，函館

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

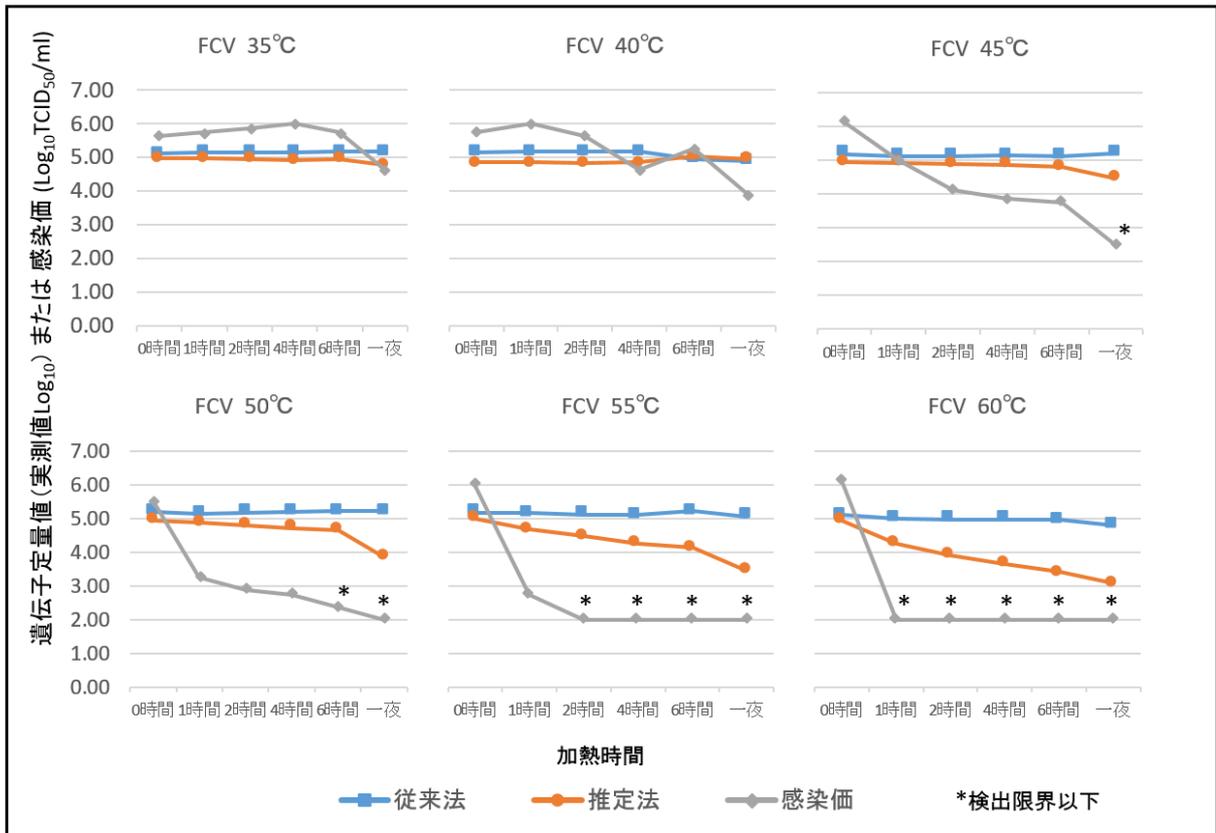


図1 各加熱温度における遺伝子定量値または感染価の変化(FCV)

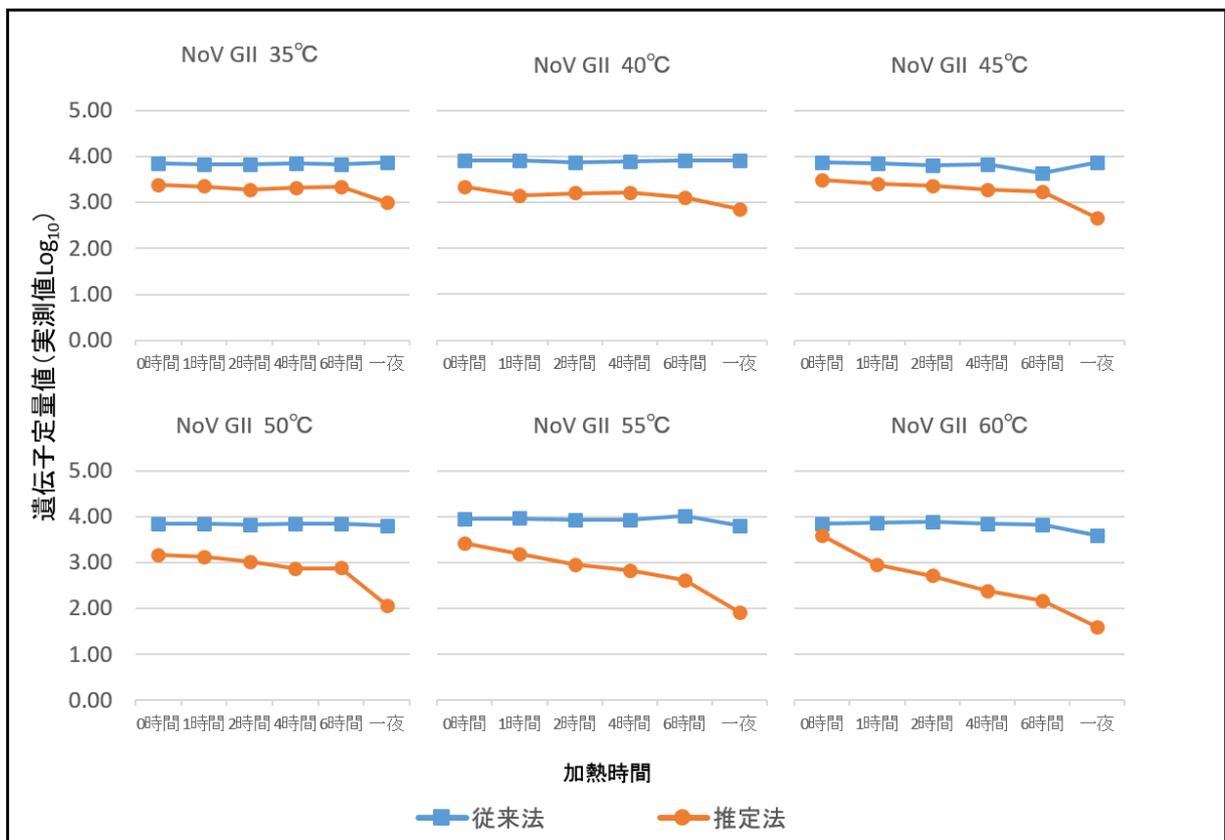


図2 各加熱温度における遺伝子定量値の変化(NoV GII)

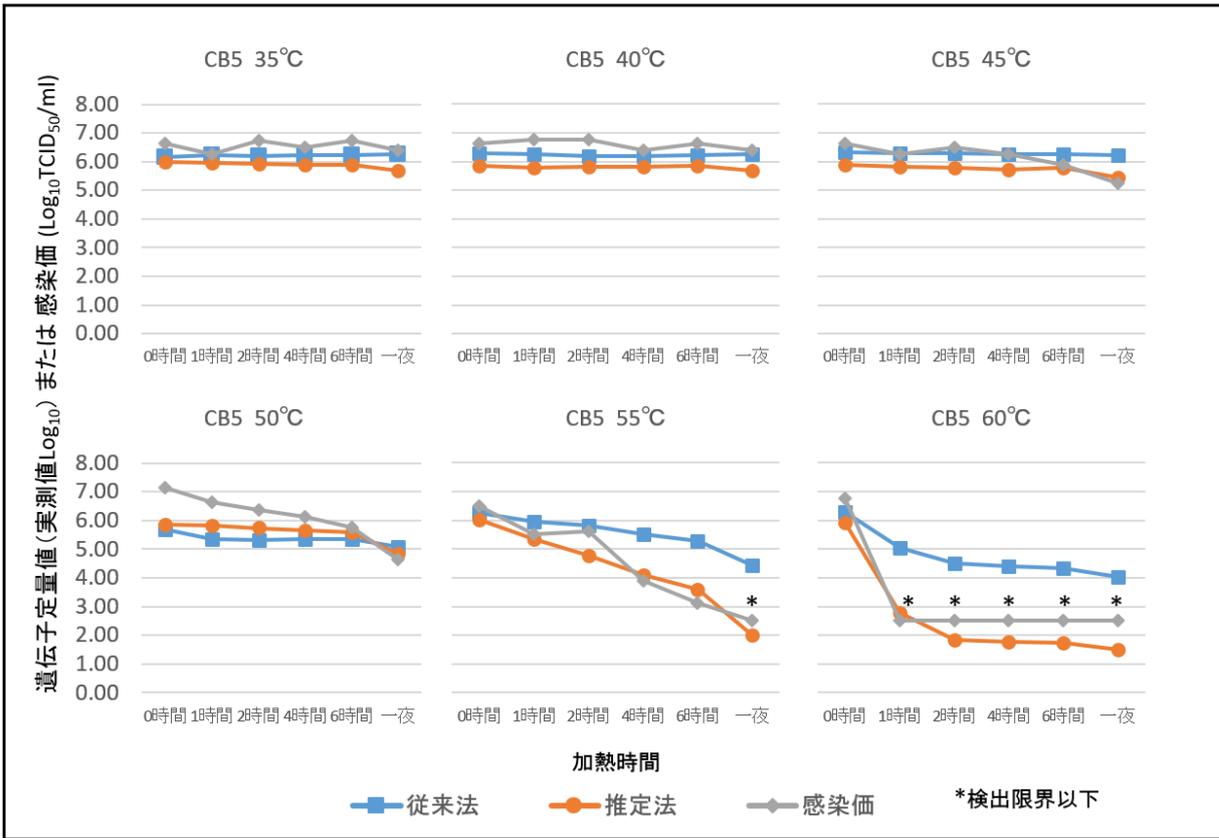


図3 各加熱温度における遺伝子定量値または感染価の変化(CB5)

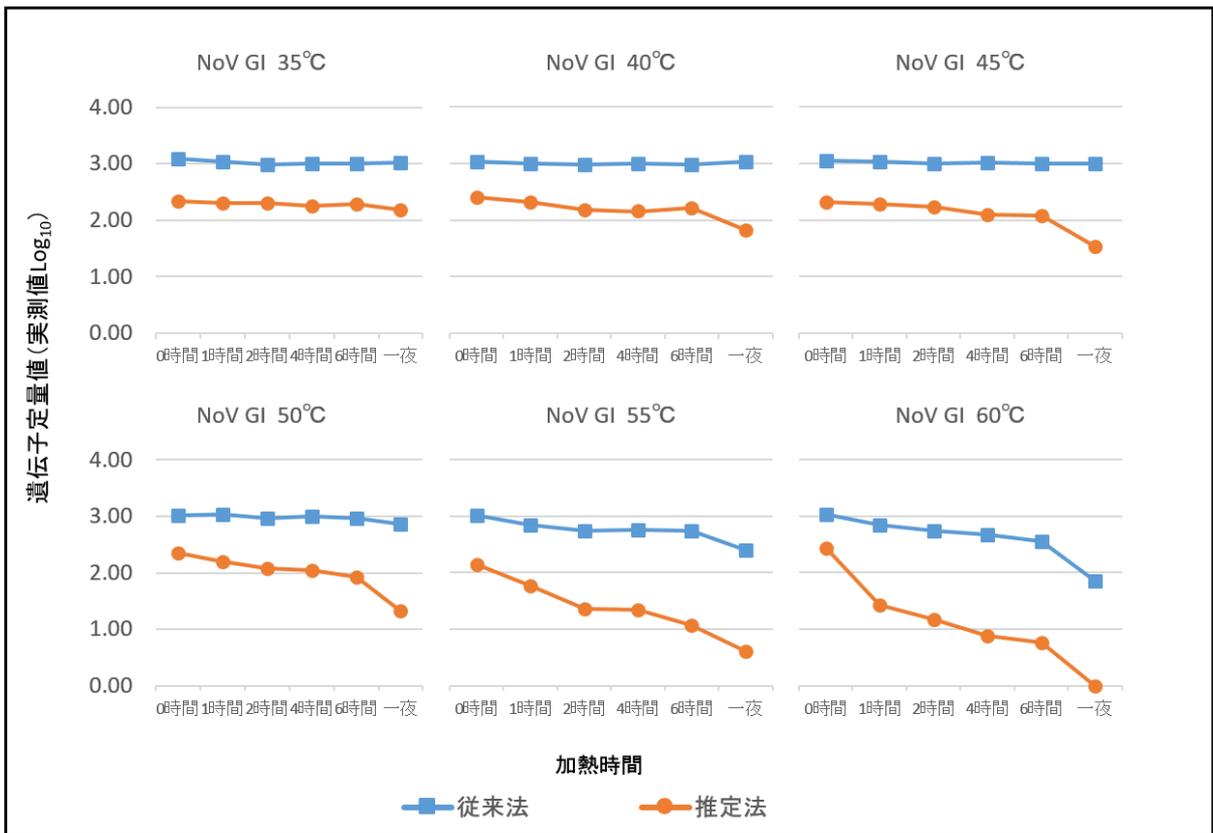


図4 各加熱温度における遺伝子定量値の変化(NoV GI)

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るが、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 μ L (CB5、 4.4×10^7 TCID₅₀/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 μ 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 μ 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

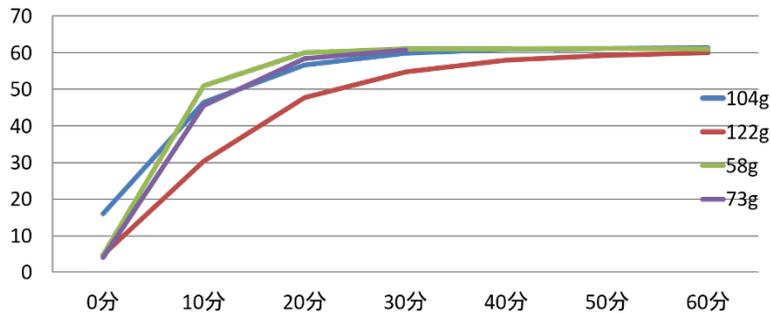
永田 文宏、上間 匡：低温加熱によるシカ肉中のウイルス感染価の変化、第 114 回日本食品衛生学会学術講演会、2018 年、広島

G. 健康危険情報

なし

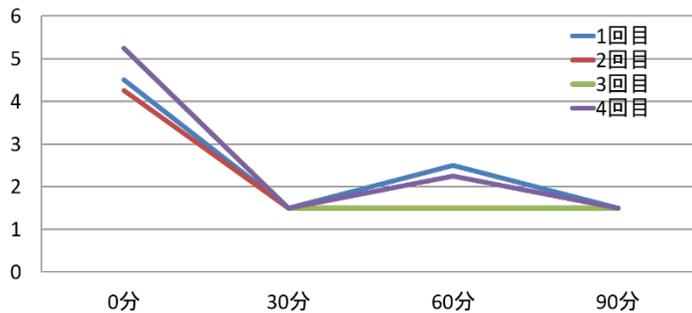
H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし



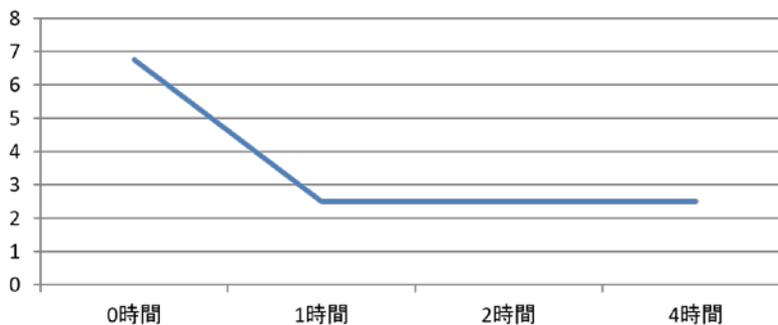
60°Cの湯煎によりシカ肉の中心温度が60度に到達するのに、100gの場合は60分、50gの場合は30分が必要であった。

図1. シカ肉の温度変化



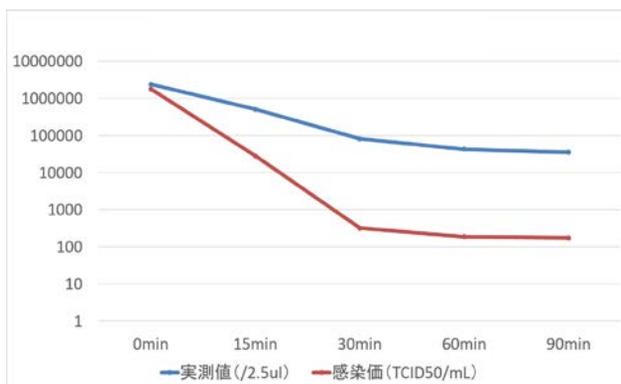
50gの場合、60°C30分の湯煎によっておよそ3logのウイルスカ価の低減が確認でき、図3の試験管内での加熱と同様の結果を得た。

図2. 60°C加熱による感染価変化(シカ肉50g)



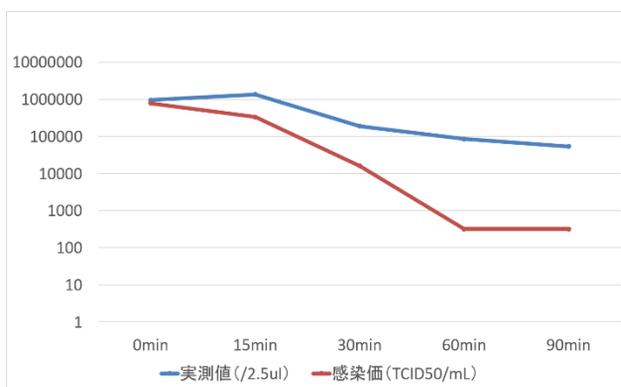
試験管内での60°C1時間の加熱によって、ウイルスカ価の低減が確認できた。

図3. 60°C加熱による感染価変化(試験管:n=2)



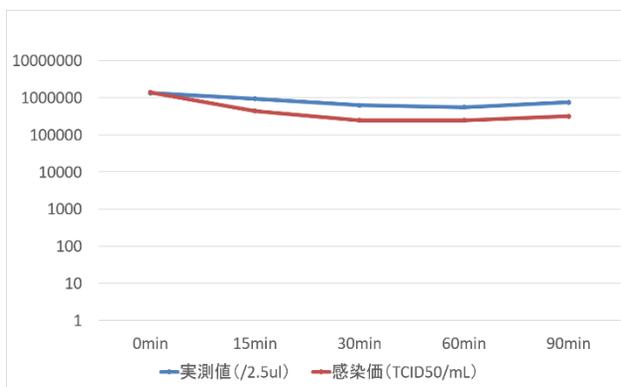
60°Cの場合、1.8log(15分)、3.8log(30分)、4.0log(60分)、4.0log(90分)の力価の低減が確認できた。

図4-1. 湯煎 60°C (n=2)



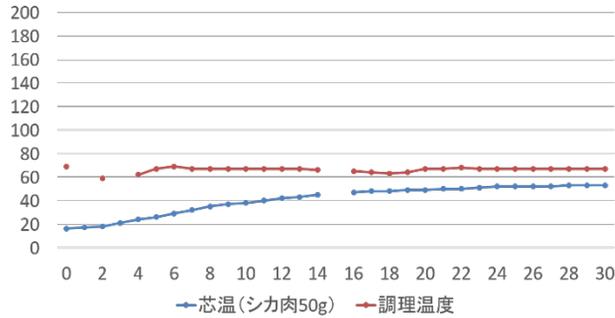
55度の場合、0.4log(15分)、1.7log(30分)、3.4log(60分)、3.4log(90分)の力価の低減が確認できた。

図4-2. 湯煎 55°C (n=2)



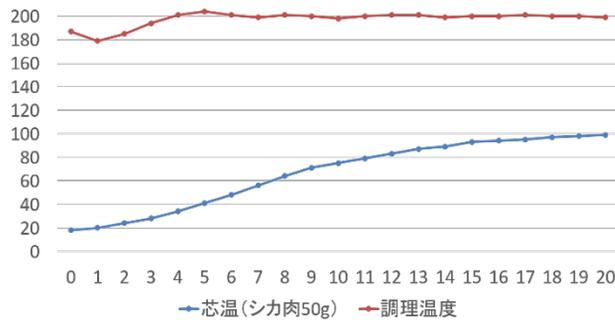
50度の場合、0.5log(15分)、0.8log(30分)、0.8log(60分)、0.6log(90分)の力価の低減が確認できた

図4-3. 湯煎 50°C (n=2)



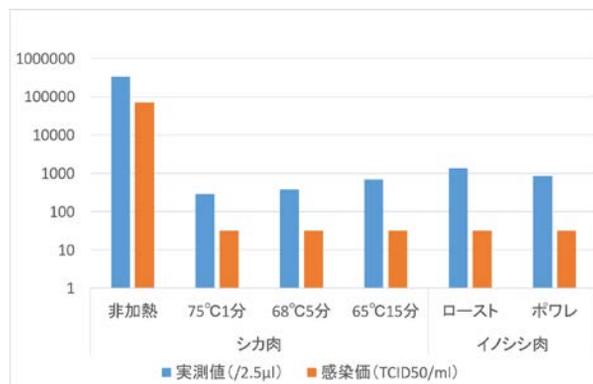
オープン加熱では、湯煎よりも中心温度が上昇するのに時間がかかり、30分加熱しても設定温度に到達しなかった。

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」
総合研究分担報告書(平成 28～30 年度)

ノロウイルスの不活化に関する研究

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
研究協力者	野田 衛	国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

現場に応じた各種のノロウイルス(NoV)の不活化法を確立することを目的として、消毒剤(各種の電解水およびファインバブル(FB))およびペットシートを用いた加熱方法を検討した。

NoV の代替としてネコカリシウイルス(FCV)とマウスノロウイルス(MNV)の系を用いて、電解水(微酸性、弱酸性、アルカリ性)およびFBの不活化効果を検討した。FCVではいずれの電解水も不活化効果が認められたが、FB単独では不活化効果は認められず、FBと弱酸性電解水の組み合わせによる相乗効果も認められなかった。一方、MNVではFBと酸性電解水の併用が最も不活化効果が高く、次いで、酸性電解水であった。両ウイルスの結果が乖離したこともあり、さらなる検討が必要である。

市販のペットシートに温水を含ませた場合に、どれくらい温度が保持されるかを検討した。その結果、卓上、床であれば、本法によるウイルスの不活化は期待できるが、カーペットでは十分な効果は期待できない結果であった。ペットシート中心部と比較して、端では高温の持続は難しく、汚染範囲が広い場合にはペットシートの敷き方に注意が必要である。

A. 研究目的

ノロウイルス(NoV)の食中毒を予防するためには、NoVに汚染した食品あるいは糞便や嘔吐物によって汚染した環境中のNoVを不活化することが重要である。

電解水は、食塩や塩酸等を電気分解することによって得られる水溶液であり、食品の洗浄・殺菌等に用いられている。電解水には、原水や生成方法の違いによ

り強酸性、弱酸性、微酸性、強アルカリ性などの電解水がある。このうち酸性の電解水は殺菌料として食品添加物として認可されている。一方、ファインバブル(FB)とは、水中で発生する気泡のうち発生時の直径が100 μ m以下の微細な気泡のことで、従来マイクロバブルやナノバブルと呼ばれていたものが統一された。直径が1 μ m以下のものは、特に、ウルト

ラファインバブルと呼ばれており、有害物質の分解除去技術や殺菌技術の一つとして注目されている。本研究では、不活化試験で NoV の代替としてよく用いられている、ネコカリシウイルス (FCV) とマウスノロウイルス (MNV) の系を用いて、各種の電解水および FB 水について、不活化効果を検討した。

一方、おう吐物の汚染があった床等の環境の NoV の汚染除去方法として、ペットシートに熱湯をかけ、レジャーシートとタオル 2 枚で上から覆い保温することにより、ノロウイルスの不活化が可能であるという報告がある。そこで、市販のペットシートを用いた場合に、どれくらい温度を保持することが可能なのかを検討した。

B. 研究方法

1. 電解水および FB による不活化

試験には FCV F9 株とネコの腎臓由来の CRFK 細胞、MNV とマウスのマクロファージ由来の RAW 細胞を用いた。被検液は、供与された微酸性電解水、弱酸性電解水、アルカリ性電解水、弱酸性電解水に FB を含ませたもの (FB+弱酸性電解水)、水道水に FB を含ませたもの 5 種類と対照として PBS (-) を用いた。

ウイルス液と被検液を 1:9 の割合で混合後、3 分間反応させ、10 倍段階希釈し、あらかじめ用意しておいた細胞に接種し、37°C で数日間 (~6 日程度) 培養・観察を行い、50% 感染終末点法 (TCID₅₀) で感染価を求めた。

2. ペットシートの保温試験

ペットシート (レギュラーサイズ: 44×32cm)、熱湯 (1.5L)、アルミホイル、温度ロガーを用い、卓上 (実験台)、床 (実験室=リノリウム)、タイルカーペットの上で実施した。

ペットシートの下に温度ロガーを中心と端の 2 か所設置し、熱湯をかけた後、アルミホイルで保温し、1 分間隔で温度を計測、記録した。

(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. 電解水および FB による不活化

FCV では、微酸性電解水で 3log、弱酸性電解水・アルカリ性電解水および FB+弱酸性電解水で 4log 程度感染価が低下した。(図 1) 一方、MNV では、微酸性電解水で 1log、弱酸性電解水で 3log、FB+弱酸性電解水で 4log 程度感染価が低下した。(図 2)

2. ペットシートの保温試験

ペットシートに温水を含ませた後の温度保持時間を図 3 に示した。黄色で示した部分は、各温度が 1 分間以上保持されたものを示している。床および卓上ではある程度の温度保持が確認された。一方、カーペットでは深部の温度を測定していたため、温度の上昇はほとんど認められなかった。そこで、カーペット表面の温度で測定しなおしたところ、卓上や床と同様の温度保持が確認された。

FCV および MNV で報告されている加熱

によるD値から算出された不活化条件(巻末の表参照)と比較すると、 10^{10} のウイルスの不活化に必要な63℃、5分あるいは72℃、2分の条件は概ね満たしていた。

中心部と端部について比較すると、中心部の温度保持が高い傾向にあった。

D. 考察

1. 電解水およびFBによる不活化

今回、各種の電解水およびFB水についてFCVおよびMNVに対する不活化効果を検討した。電解水については、FCVでは微酸性、弱酸性およびアルカリ性電解水で3log以上の不活化効果が認められたが、MNVでは微酸性電解水で1log、弱酸性電解水で3logの低下が認められたが、アルカリ性電解水では不活化効果は認められなかった。MNVはFCVに比べて、pH安定性が高いと報告されており、反応時間が3分間と短いことから、この結果は妥当であるといえる。

FBについては、FB+水道水ではFCVおよびMNVで不活化効果は観察されなかったことから、FB自体によるウイルス不活化効果は期待できないものと思われた。一方、FB+弱酸性電解水では、弱酸性電解水と概ね同等の不活化効果を示したが、この不活化効果は、弱酸性電解水によるものと思われる。なお、FCVは弱酸性電解水単独と同程度であったが、MNVでは若干、FBを含むものの不活化効果が高く、FBと微酸性電解水の併用により相乗/相加効果が生じる可能性は否定できない。一方、今回の実験において、出荷時の被検液に含まれるFBの数は一定量以上入っていることがメーカーによって確認されている

が、試験時のFBの数を計ることができないため、FBの効果がないとは言い切れない状況である。それらのことを含めて、今後詳細に検討する必要がある。

また、以上のように、被検液のFCVやMNVに対する不活化効果は必ずしも同じではなかったことから、消毒剤等の不活化効果の判定には複数のウイルスを用いて評価を行う必要がある。

2. ペットシーツの保温試験

おう吐物の汚染があった床等の環境のNoVの汚染除去方法として、ペットシーツに熱湯をかけ、レジャーシートとタオル2枚で上から覆い保温することにより、ノロウイルスの不活化が可能であるという報告があることから、同様の試験を実施し、温度変化等について検証した。ノロウイルスの加熱による不活化に関しては、従来はボランティアの感染実験により、60℃、30分で完全には不活化されないと報告されていたが、2016年に発表されたヒト腸管エンテロイドによるノロウイルスの培養に成功した論文では60℃、15分で不活化されたと報告されている。ウイルスの不活化はウイルスが存在する環境(有機物の有無等)やウイルス汚染量等により変化するため、上記のデータは必ずしも直接比較できるものではない。一方、FCVやMNVについてはD値(ウイルス量を1/10に減少させるのに必要な時間)が報告されており、参考に巻末に示した。そのデータに基づくと、 10^{10} のウイルスを1に減少させるためには56℃で35分(MNV)から68分(FCV)、63℃で5分、72℃で2分が必要となる。我々のFCVを用い

た汚染環境(10%Beef extract 加 PBS(-))における不活化実験では、75℃、2分、70℃、3分で不活化できている。今回のペットシートに熱湯を加えた場合の温度の保持時間は、卓上や床のように表面が平滑な環境では概ね上記の不活化条件を満たしており、汚染量を低減させる手段としては利用可能であると考えられた。一方、カーペット(絨毯)については、表面では不活化が期待できる温度が保持されたが、深部では60℃以上の温度には多くの場合達することはなかった。そのため、カーペット等の表面に凹凸を持つものに対しては、本方法の適応は困難であると思われる。

また、ペットシートの中心部と端の部分では端の部分の温度低下が早い傾向にあった。汚染が広範囲に及ぶ際には、そのことを考慮した上で、シートの覆う場所を変えて複数回処理を行うなどの対応が必要と思われた。

E. 結論

FCVにおいては、電解水のpHによる不活化効果が認められたが、FBの有無による有意な差は認められなかった。MNVにおいては、FB酸性で最も高い不活化効果が認められたが、さらなる検討が必要であ

る。代替ウイルスによって、pH安定性が異なるため、両方のウイルスを用いて評価試験を実施することが望ましい。今回の結果では、電解水とFBの明らかな相乗効果は認められなかった。

ペットシートに熱湯を加えて加熱する方法は、床や卓上などの表面が平滑な環境では汚染したノロウイルスの不活化が期待できる。ただし、カーペット(絨毯)などの表面に凹凸があるものは不活化効果は期待できない。また、ペットシートの端では高温の持続は難しいため、広範囲にペットシートを敷き詰める際には注意が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表：なし
2. 学会発表：なし

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

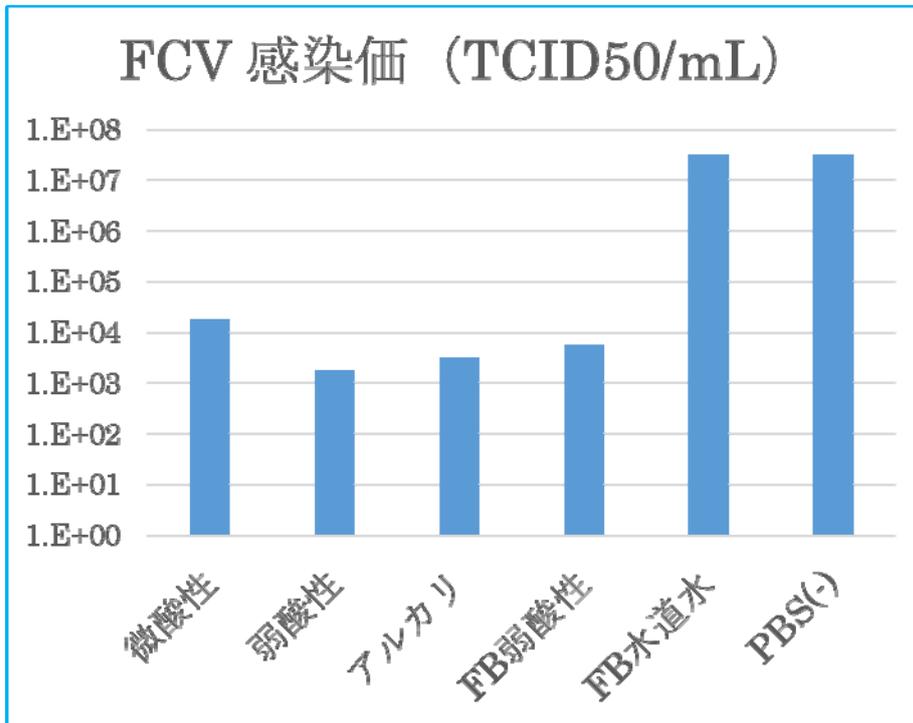


図 1：各種消毒剤等による FCV の不活化

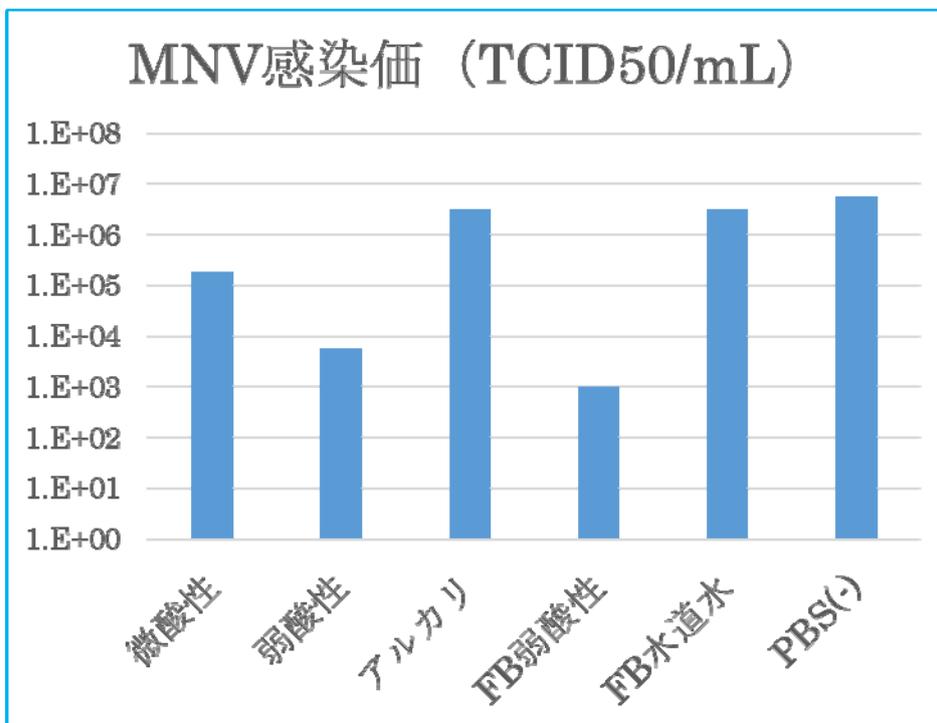


図 2：各種消毒剤等による MNV の不活化

日付	9月7日		9月8日												9月27日			
測定間隔(分)	1																	
シートサイズ(cm)	44×32																	
湯量(L)	1.5																	
ホイル	有																	
測定場所	卓上						床		絨毯		床		絨毯		床		絨毯	
測定チャンネル	B1	B2	B1	B2	B1	B2	B1	B2	B1	B2	B1	B2	B1	B2	B1	B2	B1	B2
85℃以上(回数)	0	1	0	9	1	7	1	2	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0
80℃以上	2	17	0	20	3	17	2	4	0	0	3	3	0	0	2	0	0	0
75℃以上	9	31	7	34	8	28	3	7	0	0	6	7	0	0	4	1	0	0
70℃以上	15	47	14	50	13	42	6	12	0	0	9	14	0	0	6	4	0	0
65℃以上	24	63	22	68	19	58	9	18	5	0	12	23	0	0	10	11	0	0
60℃以上	35	82	32	91	28	78	12	25	14	0	17	33	0	8	15	21	0	0
85℃以上(分)	0	0	0	8	0	6	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
80℃以上	1	16	0	19	2	16	1	3	0	0	2	2	0	0	1	0	0	0
75℃以上	8	30	6	33	7	27	2	6	0	0	5	6	0	0	3	0	0	0
70℃以上	14	46	13	49	12	41	5	11	0	0	8	13	0	0	5	3	0	0
65℃以上	23	62	21	67	18	57	8	17	4	0	11	22	0	0	9	10	0	0
60℃以上	34	81	31	90	27	77	11	24	13	0	16	32	0	7	14	20	0	0

図3：ペットシートに熱湯を加えた後の加熱の持続時間（卓上、床、カーペット深部）

日付	9月30日				10月3日	
測定間隔(秒)	10					
シートサイズ(cm)	44×32					
湯量(L)	1.5					
ホイル	有					
測定場所	カーペット表面					
測定チャンネル	B1	B2	B1	B2	B1	B2
85℃以上(回数)	0	19	0	17	0	13
80℃以上	0	54	0	54	8	41
75℃以上	7	96	9	99	21	88
70℃以上	32	144	34	149	38	143
65℃以上	61	200	65	208	60	204
60℃以上	94	268	101	281	88	278
85℃以上(分)	0	3	0	2	0	2
80℃以上	0	8	0	8	1	6
75℃以上	1	15	1	16	3	14
70℃以上	5	23	5	24	6	23
65℃以上	10	33	10	34	9	33
60℃以上	15	44	16	46	14	46

図4：ペットシートに熱湯を加えた後の加熱の持続時間（カーペット表面）

(参考) 表 FCV および MNV の各種ウイルス量における不活化に必要な時間

加熱 温度	供試 ウイルス	D 値	各ウイルス量(log10)を1に減少させるのに必要な時間(分)							
			3	4	5	6	7	8	9	10
	MNV	3.473	11.0	14.0	18.0	21.0	25.0	28.0	32.0	35.0
63°C	FCV	0.406	2.0	2.0	3.0	3.0	3.0	4.0	4.0	5.0
	MNV	0.435	2.0	2.0	3.0	3.0	4.0	4.0	4.0	5.0
72°C	FCV	0.118	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	2.0	2.0
	MNV	0.166	1.0	1.0	1.0	1.0	2.0	2.0	2.0	2.0

文献(Cannon JL, et al.:J Food Prot. 69:2761-2765(2006))のD値を基に作成

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」
総合研究分担報告書(平成 28～30 年度)

ノロウイルスの培養に関する研究

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
研究協力者	野田 衛	国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

ノロウイルス (NoV) については、2016 年にヒト腸管細胞由来のエンテロイドを用いた増殖系が新たに示されたが、用いる細胞の特殊性や培養に必要な試薬等のコストの面などから、実用化には程遠い。一方、ヒトノロウイルスの増殖には、組織血液型抗原を有する細菌や胆汁などが関与していることが示されている。本研究では、ヒト腸管由来の Caco-2 細胞および培養に関与するとされるそれらの関連物質を用いて、NoV 増殖系の構築を目指す。現在は Caco-2 細胞を用いて、安定的に上皮構造を形成させることが可能となっており、腸内細菌や、胆汁酸を培地に添加して腸内環境の再現を試みているところである。

A. 研究目的

2016 年 9 月に腸管幹細胞に由来するエンテロイドの単層培養によって複数のノロウイルス (NoV) 遺伝子型株の増殖に成功したとする Estes らのグループによる論文がサイエンス誌に報告された。用いる細胞の特殊性や培養に必要な試薬等のコストなどに課題があり、まだまだ実用化には程遠く、一般的な研究室で直ちに実施することは困難と思われる。

そこで本研究では、ヒトの腸管環境を再現することで増殖系を構築していることに着目し、ヒト結腸癌由来の株化細胞である Caco-2 細胞を用いて、NoV 増殖系の構築を目指す。Caco-2 細胞は VLP を用いた実験で、VLP を取り込むことが示されているほか、実験室培養で、腸上皮構造を形成するように分化させることが可能であり、試験管内で腸管環境を模することが可能と考えられる。

また、Jones らは、NoV の B 細胞への感染に、組織血液型抗原 (H 抗原) を発現する腸内細菌 (*Enterobacter cloacae*) が関与していると報告している。さらに、Estes らの系では、培養中の胆汁の存在が重要であることが示されている。そこで、まず、NoV 感染時の腸内環境を再現するため、Caco-2 細胞を培養する際に、培地に腸内細菌および、胆汁の主成分である胆汁酸を添加する等の条件検討を行った後、患者糞便材料の遠

心上清を用いて、Caco-2 細胞での NoV の培養を試みる。

B. 研究方法

1. Caco-2 細胞 継代

継代用培地として、DMEM + 10%FBS + 1%NEAA + 100 U/ml Penicillin-100 µg/ml Streptomycin を用いる。

継代方法は、Caco-2 細胞フラスコ内の培地を除去し、10ml PBS (-) で洗浄した後、0.25% Trypsin-EDTA を 2ml 加え、37°C-5% CO₂ にて 1~3 分インキュベートし、細胞をはがす。4ml 培地で懸濁し、15ml チューブに移し、4°C で 1000rpm 5 分遠心分離する。上清を除去し、培地を 5ml 加えピペティングする。フラスコに培地を加え、細胞懸濁液を加える。37°C-5%CO₂ で培養する。

2. Caco-2 細胞 単層上皮細胞への分化

分化用培地として、Enterocyte Differentiation Medium+0.08% MITO-Serum Extender を、分化用プレートは BioCoat Fibrillar Collagen Cell Culture Insert を用いる。

まず、分化用プレートへの Caco-2 細胞接種を行う。インサート内に予め 37°C で温めておいた継代用培地 200µl を入れ、室温で 30 分放置する。Caco-2 細胞を継代と同様に処理し、培地 5ml に懸濁した段階で細胞数を計測する。インサート内の培地を除去し、インサート内に 4×10⁵ cells/ml の細胞懸濁液を 500µl ずつ加える。ウェル側に培地を 1000µl 加え、24 時間培養する。

分化誘導方法は、1 日目に、Millicel-ERS にて各ウェルの抵抗値を測定した後、ウェル側(下)→インサート側(上)の順で培地を除去する。分化用培地をウェル側に 1000µl、インサート側に 500µl 加え 24 時間培養する。2 日目、3 日目も同様に分化誘導を行い、抵抗値が 800~1000 で分化完了となる。

(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. 研究結果および考察

NoV の培養に関する各種の論文を参考に、NoV の培養に関与する腸内細菌 (*Enterobacter cloacae*)、胆汁等を準備した。現在、Caco-2 細胞を用いて、安定的に上皮構造を形成させることが可能となっている。現在、腸内細菌の添加、胆汁酸等の添加条件の検討を行い、Caco2 細胞での腸内環境の再現を試みているところである。

D. 結論

今年度は、NoV の培養に関する情報収集を行い、Caco-2 細胞の培養に着手した。現在は Caco-2 細胞を用いて、安定的に上皮構造を形成させることが可能となっており、腸内細菌や、胆汁酸を培地に添加して腸内環境の再現を試みているところである。

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
- 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」
総合研究分担報告書(平成 28～30 年度)

腸管系病原ウイルス培養細胞の探索に関する研究

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
研究協力者	高木弘隆	国立感染症研究所
研究協力者	野田 衛	国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

食品媒介性病原ウイルスのうちノロウイルス等の腸管病原性ウイルスには現在簡便で実用的な実験室内培養系が存在しない。そのため食品中でのウイルスの生存性や、消毒剤によるウイルスの殺菌効果を直接評価することが出来ず、培養細胞を用いた簡便な培養系の開発が求められている。腸管系病原ウイルスのうち、ブタサポウイルスは 2004 年に、培養細胞を用いた培養系に胆汁酸が必須であることが報告された(Kyeong-Ok et al, PNAS, vol. 101(23), 2004)。また、ヒトノロウイルスの実験室内培養についても、2016 年にエンテロイドを用いた培養系が報告され、この中でも胆汁がウイルスの増殖に効果的であることが示されている(Ettayebi et al, Science, vol. 353 (6306), 2016)。上記のように胆汁に含まれる成分が腸管系病原ウイルスの培養系に必須である可能性が示されていることから、いくつかの腸管由来細胞株の培養系に胆汁成分を添加した際の培養条件について検討した。今後は今回の培養条件のもと、ウイルスの増殖性について検討していく予定である。

A. 研究目的

ウイルスは 2004 年に、培養細胞を用いた培養系に胆汁酸が必須であることが報告された(Kyeong-Ok et al, PNAS, vol. 101(23), 2004)。

また、ヒトノロウイルスの実験室内培養についても、2016 年にエンテロイドを用いた培養系が報告され、この中でも胆汁がウイルスの増殖に効果的であることが示されている(Ettayebi et al, Science, vol. 353 (6306), 2016)。

腸管系病原ウイルスのうち、ブタサポウ

上記のように胆汁に含まれる成分が腸管系病原ウイルスの培養系に必須である可能性が示されていることから、ノロウイルスの培養系構築を目的に、いくつかの腸管由来細胞株について、胆汁成分存在下での培養条件を検討した。

B. 研究方法

1. 細胞株

Caco-2 細胞、INT407 細胞、HT29/219 細胞を用いた。

Caco-2 細胞は増殖培地として 5%FBS-DMEM/F12 培地を使用した。

INT407 細胞は増殖培地として 5%FBS-DMEM/F12 培地を使用した。

HT29/219 細胞は増殖培地として 5%FBS-DMEM を使用した。

2. 胆汁成分

ウシ胆汁末 (0.2%)、

ブタ胆汁末 (0.2%)

コール酸 (CA 10mM、DCA 10mM、GCA 10mM、GCDCA 10mM、CDCA 3.3mM)、

マレイン酸 10mM、オレイン酸 10mM をストック溶液として用いた。

3. 培養方法

胆汁酸は、ストック液：培地＝1：1 で混合したものから、2 倍階段希釈で 2-1 から 2-8 までをあらかじめ準備し、定着後に 96 穴プレートに静かに加え

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. 結果と考察

Caco-2 細胞、INT407 細胞、HT29/219 細胞の 3 種類の培養細胞についてウシ胆汁、ブタ胆汁酸、5 種類のコール酸 (CA、DCA、GCA、GCDCA、CDCA)、マレイン酸、オレイン酸について、細胞毒性を示さない最大の添加量を決定した。細胞によって許容する胆汁成分の濃度は異なり、新たに細胞株を検討する際には、それぞれの細胞で培養条件を詳しく検討する必要がある。

今後、糞便材料等を用いて腸管系ウイルスの増殖性について検討していく予定である。

D. まとめ

3 種類の腸管系細胞株について、胆汁成分などの至適添加量を決定した。

E. 研究発表

1. 論文発表：なし
2. 学会発表：なし

F. 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」
総合研究分担報告書(平成 28～30 年度)

ノロウイルス代替ウイルスとしての コクサッキーウイルス B5 型のエタノール感受性の再評価

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

研究要旨

消毒剤によるノロウイルスの不活化試験の評価は、ノロウイルスの培養が困難なために、培養細胞を用いてウイルス力価を測定できるネコカリシウイルスなどの代替ウイルスを用いて実施される。これまで、当所ではウイルスの長期生存試験や、加熱、紫外線、高圧処理等によるウイルス不活化試験の評価に主にネコカリシウイルスとコクサッキーウイルス B5 型(CB5)を用いてきた。近年エンベロープを持たないウイルスに対しても不活化効果を持つとされる様々なエタノール系消毒剤が市販されており、これらエタノール系消毒剤のなかには、3 分間の反応で CB5 を不活化できるものを確認している。しかしながら、CB5 のエタノール自体に対する感受性については試験されていなかった。そこでエタノール系消毒剤に対する感受性試験に用いる代替ウイルスとして CB5 が適切であるか否かについてデータを得るために、エタノールによる CB5 の不活化試験を実施し、CB5 が代替ウイルスとして適当か再評価を行った。その結果、局方エタノール、終濃度 80%(ウイルスと混合した時に 80%)のエタノールは、反応時間 60 秒で速やかに CB5 を 4log10 程度不活化し、CB5 がエタノールに対して高感受性であることが示された。このことから、市販消毒剤のウイルス不活化試験法の標準化にむけ、CB5 はエタノール系消毒剤の評価には適さないことが示された。

A. 研究目的

現在さまざまなエタノール系消毒剤が市販され、ノロウイルス等のエンベロープを持たないウイルスに対しても、消毒・殺菌効果があるとするものも多く市

販され、誰でも入手しやすい状況となっている。

これらのエタノール系消毒剤だけでなく、市販されるさまざまな消毒・殺菌剤のウイルス不活化効果については、国内

での試験方法の標準化がされていないために、製造者等が独自に評価試験を行っており、データを示しているのが現状であり、標準的な試験方法の整備が課題となっている。

研究班では、食品媒介性の病原ウイルス、とくにノロウイルスに対する消毒剤の標準試験法の策定にむけ、代替ウイルスであるネコカリシウイルスやマウスノロウイルス、コクサッキーウイルス B5 型 (CB5) などを用いた不活化試験法を検討してきた。この中で、市販エタノール系消毒剤に対して、CB5 が 3 分の反応時間で $4\log_{10}$ 程度不活化され、感受性が比較的高いことが考えられた。

ノロウイルスの実際のエタノール感受性は培養系が無いために評価は困難であるが、CB5 がノロウイルスよりもエタノール感受性が高い場合、エタノール系製剤のウイルス不活化試験の評価は実際よりも過大評価されるリスクが生じる。

今回、CB5 のエタノール感受性の再評価のために、局方エタノール、終濃度(ウイルスと混合時)80%エタノール、次亜塩素酸ナトリウムによる不活化試験を実施し、CB5 の代替ウイルスとしての適正を評価した。

B. 研究方法

1. ウイルス

国立感染症研究所より分与された CB5 を HEp-2 細胞にて増殖させ、培養上清をウイルス液として用いた。

HEp-2 細胞を感受性細胞として用い

た。増殖培地には 5%FBS-DMEM、維持培地には 2%FBS-DMEM を用いた。

3. 消毒剤

局方エタノール、エタノール(特級、99.5%)、次亜塩素酸ナトリウムを用いた。

局方エタノールは直接ウイルス液と混合し、特級エタノールは 88.8%に調整後、ウイルス液と混合した。

次亜塩素酸ナトリウムは 50、100、200ppm に調整して使用した。

4. 不活化試験

ウイルス液：消毒剤=1：9 の割合で混合後、エタノールの場合は経時的に希釈を行って反応停止とし、その後 7 倍階段希釈を行って HEp-2 細胞を用いて力価測定を行った。

ウイルス液：50、100、200ppm に調整した次亜塩素酸ナトリウム=1：9 で混合後、経時的に 0.1N チオ硫酸ナトリウムを加えて反応停止後、7 倍階段希釈を行って HEp-2 細胞にて力価測定を行った。

5. 反応時間

エタノールは 0、20、60、120、180、300 秒の 6 点で測定した。

次亜塩素酸ナトリウムは 0、20、40、60、120、180 秒で測定した。

(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. 結果

1. 局方エタノール(図 1)

6 回試験を実施し、反応時間 60 秒

で速やかに $4\log_{10}$ 程度不活化された。

2. 80%エタノール(図 2)

局方エタノールと同様に、60 秒の反応時間で速やかに $4\log_{10}$ 程度不活化された。

3. 次亜塩素酸ナトリウム(図 3)

50、100ppm では 180 秒反応後でも $1\log_{10}$ 程度の不活化であったのに対し、200ppm では 20 秒で $3\log_{10}$ 程度、60 秒反応後に $6\log_{10}$ 程度不活化された。

D. 考察

今回は、ビーフエキストラクトやペプトンなどの消毒剤に効果を低減する役割をもつ負荷剤を使用せずに、ウイルスを直接消毒剤と反応させたので、実際のキッチンの汚染などよりも、消毒剤の効果は高くなると考えられたが、次亜塩素酸ナトリウム 200ppm に近い不活化効果が認められた。

エタノールそのものに非常に高い感受性を示したことから、市販のエタノール系消毒剤に対しても、特にエタノール濃度が高い消毒剤に対して高い感受性を示

すことが推察され、ウイルスの不活化試験の評価では、消毒剤の効果を過大に評価する可能性が示唆された。

今後整備されることが期待されるウイルス不活化試験法の標準化において、CB5 はノロウイルスの代替ウイルスとして使用する場合、エタノール系消毒剤の試験ウイルスとしては適切でないことが示唆され、CB5 とは別の非エンベロープウイルスを利用する必要がある。

E. まとめ

CB5 ウイルスはエタノールに対し高感受性であることから、エタノール系消毒剤に評価におけるノロウイルスの代替ウイルスとしては不適切であることと考えられた。

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 1 : 局方エタノールによる CB5 不活化効果 (n=6)

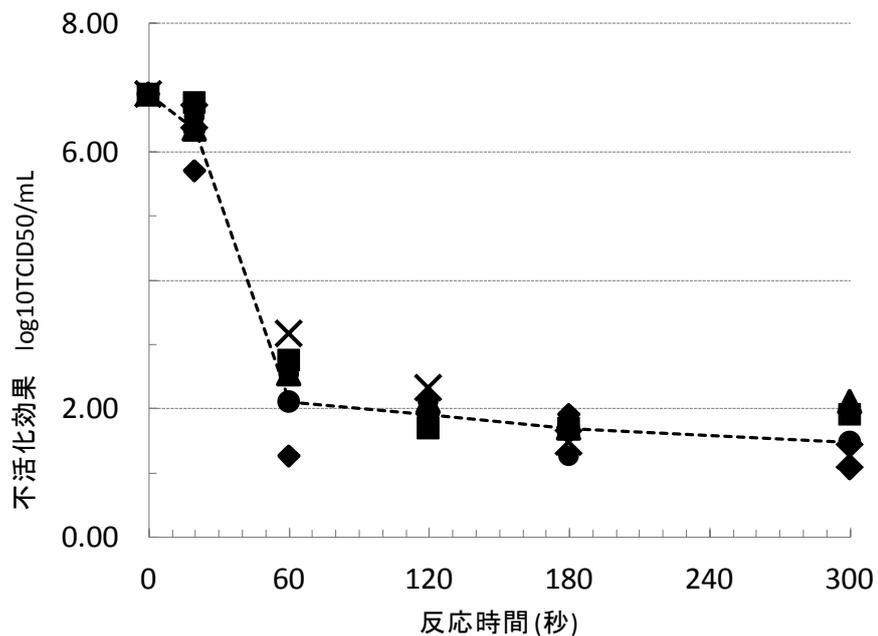


図 2 : 80%(ウイルス液と混合時)エタノールによる不活化効果 (n=6)

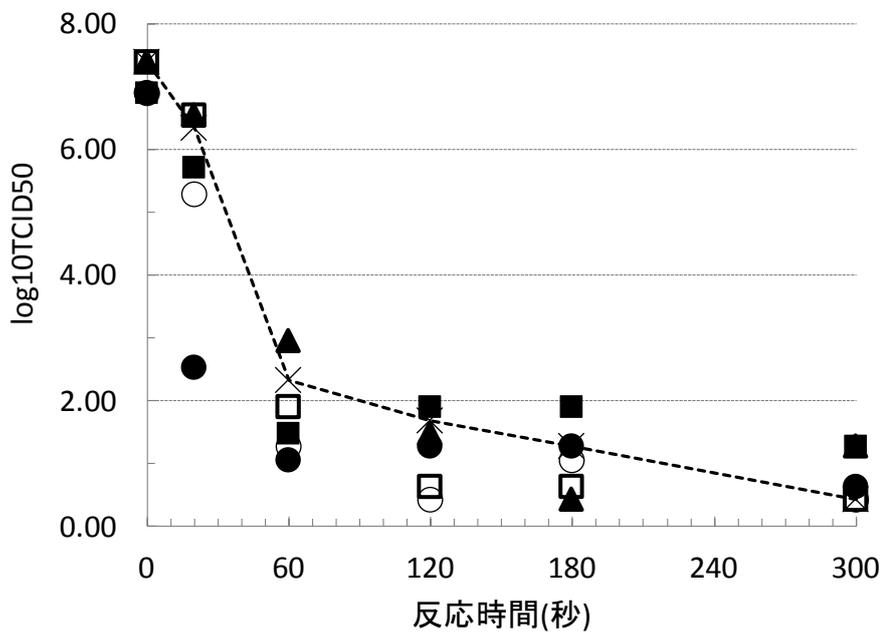
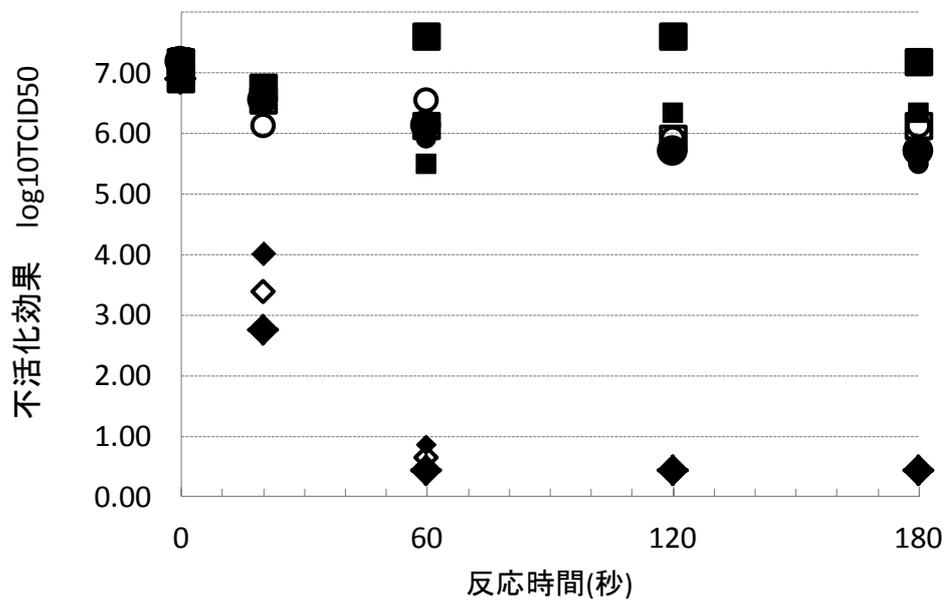


図 3 : 次亜塩素酸ナトリウムによる不活化効果(■50ppm, ●100ppm, ◆200ppm)



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」
総合研究分担報告書(平成 28～30 年度)

カキからのノロウイルス検出のための nested リアルタイム PCR 法の改良

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	永嶋 俊樹	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
	野田 衛	国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

生食用カキの安全性確保のためのノロウイルス検査として、特に生産現場においては迅速簡便なリアルタイム PCR が用いられているが、カキに含まれるウイルス量が微量なことから偽陰性(実測値 10 未満)になることが少なくない。一方、nested PCR は感度が高い反面、時間がかかる、相互汚染のリスクが高いなどの問題点がある。そこで、先行研究において両者の長所を生かした 1stPCR を 15 サイクルで行う nested リアルタイム PCR を検討したところ、ノロウイルス GI において定量値が低くでる検体がみられた。本研究では、その原因を明らかにし、検査法を改良することを目的として、1stPCR におけるプライマー濃度や DNA 合成酵素の検討、非特異的増幅の有無の確認、プライマー及びプローブの検討等を行った。その結果、カキ検体から検出されたノロウイルス GI の塩基配列を基に新たに設計したプローブ(RING-TP-n)を用いることで、カキ中のノロウイルス GI の定量値が有意に増加し、定量値が低くなった主要な原因はプローブと検体中のノロウイルス GI の塩基配列のミスマッチであることが明らかになった。一方、RING-TP-n を使用すると GI 陽性コントロール(PC)DNA では定量値が低下した。そこで RING-TP-n, RING1-TP-(a), TP-(b)の各プローブを混合した系を検討した結果、カキ検体中のノロウイルス GI の定量値は RING-TP-n 単独の場合には及ばないものの、PC の定量値は増加し、検体によらず全体的に良好な定量値が得られた。以上のことから、nested リアルタイム PCR に RING-TP-n を単独あるいは従来のプローブと混合して用いることで偽陰性の減少や、検査精度の向上が期待され、それに伴い生食用カキの安全性が向上すると考えられる。

A. 研究目的

現在生食用カキの検査にはノロウイルス検査の通知法に記載されているリアルタイム PCR 法と nested PCR が主に使われている。

迅速簡便なリアルタイム PCR は主にカキの出荷前の自主検査等に使用されているが、カキに含まれているノロウイルスは微量であるため陽性基準(実測値 10 未満)に満た

ない場合が少なくなく、また、10 コピー前後の低い定量値ではその定量性に信頼性に欠ける。一方、nested PCR 法はリアルタイム PCR 法よりも一般的に高感度であるが、時間がかかり、相互汚染を起こすリスクが高い。さらにそれら固有の問題点に加えて、リアルタイム PCR と nested PCR の結果が一致しないという問題点もある。そこで、当研究室の先行研究でリアルタイム PCR 法と nested PCR 法の長所を生かした 1stPCR を 15 サイクルで行う nested リアルタイム PCR 法を検討したところ、ノロウイルス GII においては問題なく増幅したものの、ノロウイルス GI において定量値が極端に低くなる検体が認められた。そのため、本研究では、その原因を明らかにし、検査法を改良することを目的に検討した。

B. 研究方法

1. 材料

検討に使用した検体は、ノロウイルス懸濁液 3 検体(GI.2, GI.4, GI.6), 2016 年に採取されたカキ 8 検体(GI.2=①, ③, ⑥, ⑧, GI.4=④, ⑤, ⑦, 遺伝子型不明=②)を用いた。

2. カキからのウイルスの回収, RNA 抽出および逆転写反応

カキからのウイルスの回収には、リパーゼとアミラーゼを併用した酵素処理を導入した簡便法で実施した。使用したリパーゼ溶液およびアミラーゼ溶液の調整法および簡便法の手順は以下のとおりである。

(1) リパーゼ溶液の調整法

リパーゼ(東京化成工業株式会社, LD0057) 5g に PBS(-)20ml を加え、よく混

和し、溶解後、10,000rpm, 20 分間遠心した。得られた遠心上清に等量のグリセロールを加え、使用時まで-20°Cで凍結保存した。

(2) アミラーゼ溶液の調整法

斎藤らの方法に従い、 α -Amylase 粉末(和光純薬, 017-26371) 5g に PBS(-)20ml を加え、よく攪拌した後、10,000rpm, 20 分で遠心した。得られた遠心上清を滅菌フィルターで濾過後、等量のグリセロールを加え、使用時まで-20°Cで凍結保存した。

(3) 簡便法の手順

ハサミで細切したカキの中腸腺 0.3g を 1.5ml チューブに入れ、PBS(-)700 μ l を加え、よく攪拌した。その後リパーゼ溶液 10 μ l とネコカリシウイルス 20 μ l を加え、37°C, 45 分間消化した後、10,000rpm, 20 分遠心した。遠心上清 500 μ l を別の 1.5ml チューブに移し、アミラーゼ溶液 50 μ l を加え 37°C, 45 分間消化した。その後 4 倍濃度 PEG 溶液 220 μ l を加え、混和後 10,000rpm, 20 分遠心した。遠心上清を除去し、0.5% Zwittergent in PBS(-) 200 μ l に再浮遊させた後、その全量から High Pure Viral RNA Kit (Roche)を用いて RNA 抽出を行った。抽出 RNA 50 μ l を用いて、ランダムプライマーにより逆転写反応を行い cDNA を合成した。

3. 1stPCR におけるプライマー濃度の検討

1stPCR におけるプライマー濃度を変更することにより増幅率の改善を試みた。ヒト糞便由来のノロウイルス GI の cDNA を Eagle Taq(Roche)を用いてリアルタイム PCR を行い、得られた増幅 DNA をそれぞれ

10¹, 10³ コピー (実測値) になるように希釈したものを検体 DNA とした。その検体 DNA について 1stPCR のプライマー濃度を 0.5 μM, 1 μM, 2.5 μM, 5 μM, 7.5 μM, 10 μM とし、PCR 増幅を行い、その増幅産物をリアルタイム PCR で定量した。1stPCR の条件は 94°C 5 分 → [94°C 30 秒 → 50°C 30 秒 → 72°C 1 分] × 15 サイクル → 72°C 5 分とした。

また、カキ検体由来 cDNA についてプライマー濃度 5 μM で 1stPCR を行い、リアルタイム PCR で定量した。この場合、1stPCR による 1 次増幅を行わない、通常リアルタイム PCR でも定量した。

4. 1stPCR に用いる DNA 合成酵素の検討

1stPCR に使用する DNA 合成酵素を変更することにより増幅効率が改善するかを検討した。すなわち、1stPCR に EXTAq 及び KAPATaq を用いて PCR を行い、リアルタイム PCR で定量した。1stPCR の条件は 94°C 5 分 → [94°C 30 秒 → 50°C 30 秒 → 72°C 1 分] × 15 サイクル → 72°C 5 分とした。

5. 低定量値が非特異増幅によるものかの確認

ノロウイルス GI の nested リアルタイム PCR において低い定量値を示した原因として検体中にノロウイルスが含まれておらず非特異増幅を起こした可能性が考えられる。そこで、それらの検体について nested PCR を行い、アガロースゲル電気泳動法による増幅 DNA の検出を行うとともに、一部の検体について増幅産物の塩基配列を決定した。

6. 新たに設計したプライマー及びプローブを用いた nested リアルタイム PCR の検討

nested リアルタイムにおいて低い定量値を示した原因としてカキ検体中のノロウイ

ルス GI の塩基配列と 1stPCR やリアルタイムに使用するプライマーやプローブの塩基配列にミスマッチがあることにより定量値が低くなっている可能性が考えられる。そこで検体中のノロウイルスの塩基配列を基に設計したプライマー及びプローブを用いて検査を実施し、増幅率が向上するかを確認した。検体 cDNA を COG1F と G1SKR の外側に設計した G1+F5228, G1-R5754 を用いて PCR にかけて後 ExoSap IT を用い未反応のプライマーや dNTP を除去し、シークエンス解析を行った。PCR の温度条件は 94°C 5 分 → [94°C 30 秒 → 50°C 30 秒 → 72°C 1 分] × 40 サイクル → 72°C 5 分で行った。シークエンス解析の結果を基に新しいプライマー (G1SKR-n) 及びプローブ (RING-TP-n) を設計し nested リアルタイム PCR を行った。

7. 混合プローブを用いた nested リアルタイム PCR の検討

RING1-TP-(a), TP-(b), TP-n をそれぞれ 1:1:1, 2:1:1, 1:2:1, 1:1:2 の割合で混ぜたプローブ mix①～④を用意し、nested リアルタイム PCR を行った。RING1-TP-(a) と (b) および RING-TP-n のみを用いた系を対照とした。検体はカキ由来 cDNA①～⑧の 1stPCR 産物をまとめたものを使用した。

(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

ヒト糞便由来ノロウイルス GI の cDNA を用いて 1stPCR におけるプライマー濃度の違いによる増幅効率への影響を調べた。平均増幅率は、プライマー濃度 $0.5\mu\text{M}$ が 651 倍、 $1\mu\text{M}$ が 833 倍、 $2.5\mu\text{M}$ が 1,321 倍、 $5\mu\text{M}$ が 1,539 倍、 $7.5\mu\text{M}$ が 1,083 倍、 $10\mu\text{M}$ が 1,274 倍で、プライマー濃度 $5\mu\text{M}$ が最も高い増幅率を示した。

次に、カキ由来 cDNA を用いて、1stPCR におけるプライマー濃度を $5\mu\text{M}$ として nested リアルタイム PCR を行った。その結果、平均定量値は、検体①が 58.17 コピー (実測値)、検体②が 48.19 コピー、検体③が 907.95 コピー、検体④が 994.1 コピー、検体⑤が 256.12 コピー、検体⑥が 101.13 コピー、検体⑦が 49.57 コピー、検体⑧が 99.38 コピーで、検体③、④以外は定量値が低く、定量値の有意な改善は認められなかった。

2. 1stPCR に用いる DNA 合成酵素の検討

1stPCR において使用する DNA 合成酵素を換えることで、nested リアルタイム PCR における定量値が改善するかを、EXTaq と KAPATaq を用いて調べた。カキ由来 cDNA の nested リアルタイム PCR による定量値は、EXTaq を用いた場合、検体①が 105.9 コピー、②が 33.24 コピー、③が 1782.56 コピー、④が 173 コピー、⑤が 275.42 コピー、⑥が 208.75 コピー、⑦が 161.51 コピー、⑧が 152.93 コピー、KAPATaq を用いた場合、検体①が 93.18 コピー、②が 54.68 コピー、③が 2487.98 コピー、④が 2055 コピー、⑤が 319.44 コピー、⑥が 68.55 コピー、⑦が 198.74 コピー、⑧が 486.85 コピーで、両者に大きな違いは認められなかった。このことから、DNA 合成酵素を変更しても、大

幅な定量値の改善は認められないと考えられた。

3. 低定量値が非特異的増幅によるものかの確認

カキ検体において nested リアルタイム PCR で低定量を示した原因が非特異的増幅によるものかについて調べるために、カキ由来 cDNA8 検体について nestedPCR を行った後、アガロースゲル電気泳動により増幅 DNA の有無を確認した。各検体につき、3 回繰り返し実験を行った。その結果、4 検体は 3 回中 3 回陽性、他の 4 検体は 3 回中 2 回が陽性になった。得られた DNA の一部について、後述の方法により塩基配列を決定したところ、すべてノロウイルス GI の塩基配列であった。これらの結果から、カキ由来 cDNA のすべての検体にノロウイルスが含まれており、nested リアルタイム PCR において低定量値を示したものは非特異増幅によるものではないことが示された。

また、カキ由来 cDNA 中に存在する PCR 阻害物質により定量値が低下する可能性を調べるために、ノロウイルス GI の陽性コントロール DNA に等量のカキ由来 cDNA あるいは遺伝子解析用蒸留水を添加して、定量値を比較したところ、両者に違いはなく、PCR 増幅阻害が起こっている可能性は低いものと考えられた(データ示さず)。

4. 新たに設計したプライマー及びプローブを用いた nested リアルタイム PCR の検討

カキ検体に含まれるノロウイルス RNA の塩基配列と nested リアルタイム PCR に使用するプライマーやプローブの塩基配列のミスマッチにより定量値が低くなっている可能性を調べるために、新しいプ

ライマーやプローブを設計した。すなわち, nestedPCR の増幅産物の塩基配列をダイレクトシーケンス法で決定し, その塩基配列について blast 検索を行い, 1stPCR の増幅領域(COG1F~G1SKR)より外側の塩基配列が登録されているものの中でスコアの一番高いものを基に COG1F~G1SKR の外側にアニーリングするプライマー-G1+F5228, G1-R5754 を設計した(未発表)。次に G1+F5228, G1-R5754 で PCR 増幅を行い, 得られた PCR 断片(5228bp~5754bp)の塩基配列を決定し, COG1F, COG1R, G1SKR, RING1-TP-(a), RING1-TP-(b)の各プライマーやプローブの配列と比較した。その結果, G1SKR, RING1-TP-(a), RING1-TP-(b)の位置に配列が一致しない箇所が確認された(表 1)。そこで, 検体中のノロウイルス RNA の塩基配列を基にプライマー及びプローブを設計し, それらを用いて nested リアルタイム PCR の定量値が改善されるかを調べた。予備実験においてプライマーを G1SKR から G1SKR-n に変更しても実測値に変化はみられなかった。一方, プローブを RING-TP-n に変更すると全てのカキ検体において有意な定量値の増加がみられた(表 2)。一方, ポジティブコントロールの定量値は逆に低下した。このことから, nested リアルタイム PCR において低定量値を示した原因は, リアルタイム PCR においてプローブのミスマッチによりみかけ上低く定量されていることが大きな原因の一つであることが示された。一方, RING-TP-n を使用すると, 陽性コントロール DNA の定量値は低くなり, これもプローブの塩基配列とコントロール DNA の塩

基配列のミスマッチによるものと考えられた。

5. 混合プローブを用いた nested リアルタイム PCR の検討

前記の検討より, リアルタイム PCR に TP-n を使用することによりカキ検体のノロウイルス GI の定量値は大幅に増加するものの, 陽性コントロール DNA の定量値は低下したことから, RING1-TP-(a), TP-(b), TP-n を混合した場合の定量値を調べた。その結果, 検討した混合条件のいずれにおいても, RING1-TP-(a), TP-(b)を用いた場合と比較して, カキ検体では定量値の増加, 陽性コントロール DNA では定量値の低下が認められ, TP-n を単独で使用した場合と比較してカキ検体では定量値の低下, 陽性コントロール DNA では定量値の増加が認められ, 平均的に良好な結果が得られた(図 1)。特に, プローブの混合比が RING1-TP-(a) : TP-(b) : TP-n=1:1:2 の場合の定量値が高くなる傾向が認められた。

D. 考察

今回, 1stPCR を 15 サイクル行った後, リアルタイム PCR を行う nested リアルタイム PCR において, ノロウイルス GI で認められた低定量値を示す原因について調べた。その結果, リアルタイム PCR に使用するプローブを変更したことで陽性コントロールを除くすべてのカキ由来検体において有意に nested リアルタイム PCR によるノロウイルス GI 定量値が増加した。このことから, 低い定量値を示していたのは, リアルタイム PCR におけるプローブと検体中のノロウイルスの塩基配列のミスマッチ

によることが主要な原因であることが明らかとなった。このことは、通常のリアルタイム PCR においても、検体中のノロウイルスの塩基配列がプローブとミスマッチを起こしている場合は、見かけ上低く定量される可能性があることを示唆する。さらに今回カキ検体中に含まれていたノロウイルス GI は遺伝子型 GI.2 と GI.4 であり、比較的カキから高頻度に検出される遺伝子型であった。このことから、特に、カキの検査におけるノロウイルス GI のリアルタイム PCR による定量値は低く定量されている可能性が少なくないと考えられた。

一方、今回新たに設計したプローブを使用した場合、GI 陽性コントロール DNA では定量値が逆に低下した。そのため、従来のプローブと新たに設計したプローブを混合した増幅系を検討した結果、RING1-TP-(a)、TP-(b)を用いた場合と比較して、カキ検体では定量値の増加、陽性コントロール DNA では定量値の低下が認められ、TP-n を単独で使用した場合と比較してカキ検体では定量値の低下、陽性コントロール DNA では定量値の増加が認められ、検体の種類(遺伝子型)によらず平均的に良好な結果が得られた(図 1)。しかし、それぞれを単独で使用する場合と比較して満足できる定量値ではなかったことから、混合比や濃度等を含め、今後検討する必要がある。

通知法¹⁴⁾では2003年に設計されたプライマー及びプローブを使用しているが、今回使用した2016年に採取したカキに含まれているノロウイルス GI.2、GI.4 と塩基配列が合わなかったことから、通知法に記載されているプライマー及びプローブが近年のノロウイルスの配列に合わなくなっ

ている可能性がある。そのため将来的にノロウイルス GI だけでなく GI.2 などでもプライマー及びプローブが合わなくなる可能性があるため、定期的にノロウイルスの塩基配列をチェックし、適時プライマー及びプローブを改変していくことが、常に高感度にノロウイルスを検出するために必要である。

今回使用したカキに含まれていたノロウイルスの遺伝子型は GI.2 と GI.4 であったが、他の遺伝子型を RING-TP-n を用いた時に高感度にノロウイルスを検出できるかをみるために他の遺伝子型でも検討が必要であると考えられる。また、使用するノロウイルスも個体によって塩基配列が異なる場合があるので、より多くの検体を使用してデータを蓄積することが必要である。他の遺伝子型でも高感度に検出することができれば、RING-TP-n を用いることで現在のノロウイルス検査よりも偽陰性を減らすことができ、生食用カキの安全性がより高まることが期待される。

E. 結論

リアルタイム PCR に用いるプローブを RING1-TP-(a)、TP-(b) から RING-TP-n に変更することで定量値が増加した。そのため RING-TP-n は従来のプローブより高感度にノロウイルスを検出することができると考えられる。また RING-TP-n を用いると PC の定量値が低下したが RING1-TP-(a) の割合を低く設定したプローブ mix を用いることで PC の定量値の低下を軽減することが出来た。しかしプローブ mix を用いることでカキ検体自体の定量値が RING-TP-n のみを用いた時よりも低下する。そのためプローブ

の割合についてはさらに検討する必要がある。また今回使用したカキに含まれていたノロウイルスの遺伝子型は G I . 2 と G I . 4 であったが他の遺伝子型を RING-TP-n を用いた時に高感度にノロウイルスを検出できるかをみるために他の遺伝子型についても検討が必要である。

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

表 1. プライマー、プローブとカキ由来ノロウイルス GI の塩基配列の比較

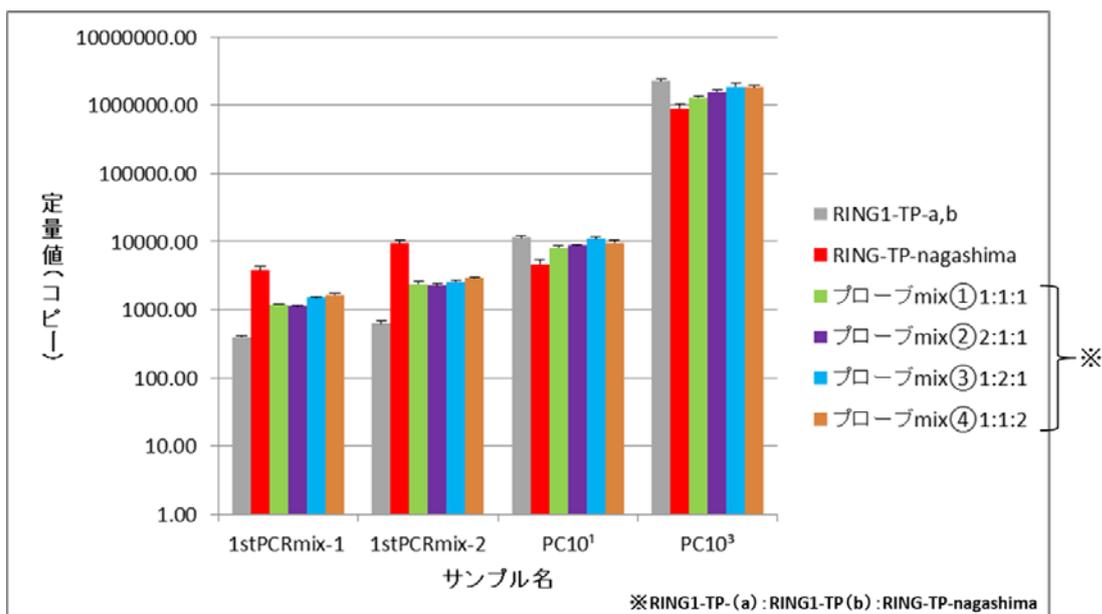
プライマー名 サンプル番号	遺伝子型	G1SKR (CCA ACC CAR CCA TTR TAC A)	RING1-TP(a) (AGA TYG CGA TCY CCT GTC CA)	RING1-TP(b) (AGA TCG CCG TCT CCT GTC CA)
①	GI.2	CCA ACC CAG CCA TTA TAC A	抽出エラー	抽出エラー
②	不明	抽出エラー	抽出エラー	抽出エラー
③	GI.2	CC C ACC CAG CCA TTG TAC A	AGA TCG CA A TCT CCT G CC CG	AGA TCG CA A TCT CCT G CC CG
④	GI.4	CC C ACC CAG CCA TTG TAC A	AGA TCG CA A TCT CCT G CC CG	AGA TCG CA A TCT CCT G CC CG
⑤	GI.4	CC C ACC CAG CCA TTG TAC A	AGA TCG CA A TCT CCT G CC CG	AGA TCG CA A TCT CCT G CC CG
⑥	GI.2	CCA ACC CAG CCA TTA TAC A	AGA TCG CA A TCT CCT G CC CG	AGA TCG CA A TCT CCT G CC CG
⑦	GI.4	CC C ACC CAG CCA TTG TAC A	AGA TCG CA A TCT CCT G CC CG	AGA TCG CA A TCT CCT G CC CG
⑧	GI.2	CCA ACC CAG CCA TTA TAC A	AGA TCG CA A TCT CCT G CC CG	AGA TCG CA A TCT CCT G CC CG

検体中のノロウイルスのプライマー結合領域の塩基配列においてプライマーと一致していない部位を赤で示した。抽出エラーと書かれた検体はシーケンス解析ができなかったもの。

表 2. nested リアルタイム PCR において RING-TP-(a), (b) と RING-TP-n を使用した際の実測値の比較(* = t 検定において p<0.05)

サンプル番号	RING1-TP-(a),(b)	RING-TP-nagashima
①	70.36	805.60*
②	49.65	641.29*
③	1606.99	17558.61*
④	1361.47	14475.90*
⑤	244.29	2654.16*
⑥	376.33	4731.83*
⑦	67.96	1056.20*
⑧	62.58	1119.38*
pc10'	11079.60	10403.76
pc10°	1714294.58	1286837.21

図 1. 混合プローブを用いた場合の nested リアルタイム PCR 定量値の比較



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」
総合研究分担報告書(平成 28～30 年度)

ノロウイルスの食中毒事件調査結果の解析と活用： ノロウイルスの健康チェック項目の検討

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 米山 朋那 (神奈川県厚木保健福祉事務所大和センター)
森口 真理子 (神奈川県衛生研究所)

研究要旨

平成 26 年に神奈川県厚木保健福祉事務所大和センター管内(以下「管内」という)で発生したノロウイルス食中毒事件の調査時に独自の患者調査票を用い、対象者に症状に関する詳細な聞き取り調査を実施した。その結果、有症者にノロウイルス感染の特徴とされる下痢、嘔吐、発熱以外の症状が認められる例が少なくなき、軽症を含み、症状に多様性が認められた。一方、便性状の変化(下痢、軟便を含む)や胃部の違和感などは共通の症状として多くの有症者で認められた。健康チェックを行っている食品関係事業者の多くは下痢や嘔吐、発熱を聞き取り項目としており、このチェックでは軽症感染を含む非典型的な症状の感染例を捉えることは困難であり、それらの症状を呈した例では、ノロウイルス感染が見落とされるとともに、「不顕性感染者」として捉えられる可能性が考えられる。そこで前述の調査における有症者の症状の特徴から、症状の共通項を含めた健康チェック票を作成した。本健康チェック票を使用することにより、軽症感染を含む非定型的な症状を呈した場合でもノロウイルス感染を疑うことができ、感染者の発見がより容易になり、食中毒防止に寄与できるものと考えられた。

A. 研究目的

ノロウイルスは、感染力が強く、感染者の吐物や便中に大量のウイルス粒子が排出される。このような特徴からノロウイルスは予防対策が最も困難な食中毒病因物質の一つとなっている。現在のノロウイルス食中毒事件は調理従事者等からの食品の二次汚染が原因となっている事例が多く、調理従事者等の健康管理などが食中毒予防対策上重要である。

一方、ノロウイルス感染における典型的な症状は下痢、嘔吐、発熱とされているが、必ずしも典型的な症状を呈さない例も報告されている。さらに、ノロウイルスに感染しても症状を呈さない、不顕性感染事例も報告されている。近年のノロウイルス食中毒事件においては、不顕性感染者の関与が示唆される事例が少なくなき、厚生労働省の平成 28 年のノロウイルスの食中毒事件の要因解析では 5 割以上が不顕性感染の調

理従事者の関与が示唆されている。

一方、食品関係事業者の多くは下痢、嘔吐、発熱を日常の健康管理のためのチェック項目としており、このチェックでは、軽症感染を含む非典型的な症状の感染例を捉えることは困難であると考えられる。

以上の背景から、本研究ではノロウイルス感染者を的確に把握することを目的として、ノロウイルス食中毒事件の調査時においてより詳細な臨床症状の把握を行い、ノロウイルス感染における詳細な症状の把握を行った。さらに、得られた症状からノロウイルス感染に共通してみられる症状などを特定し、それらを把握するための健康チェック票を作成した。

B. 研究方法

平成 26 年に管内で発生したノロウイルス食中毒事件 1 事例の調査時に独自の患者調査票を用い、対象者に症状に関する詳細な聞き取り調査を実施した。すなわち、発症者によって症状は異なり、また、個人により症状の感じ方や表現方法は必ずしも一様でないことから、胃部の症状を様々な言葉(胃部の症状：吐気、食欲不振、げっぷ、気持ちが悪い、胃部の膨満感、胃部のむかつき感)で聞き取ることが可能な調査票を作成し、それに基づき症状の聞き取りを行った。また、発熱の時間変化を聞き取った。

調査結果から、有症者の中で典型的な下痢や嘔吐の症状がなく、吐気や軟便等の軽い症状を呈した例を抽出し、症状の解析を行った。さらに、下痢、嘔吐がない有症者の症状の特徴からノロウイルス感染が疑われる症状の組み合わせを検討するとともに、発熱の傾向から体温測定時の異常を判断す

る基準となる数字を検討した。

C. 研究結果

調査対象としたノロウイルス食中毒事件は摂食者 71 名、有症者 50 名であった。有症者 50 名のうち胃部の異常を訴えたものは 88%、便性状の変化(軟便も含む)を訴えたものは 92%に認められた(図 1)。

有症者に検便検査の依頼をしたところ、3分の 1 から調査協力が得られた。検便検査によりノロウイルス感染が確認された例は 14 名であり、14 名全員胃部の異常が認められた。胃部の異常の内訳は、吐気 8 名、食欲不振 7 名、げっぷ 5 名、気持ちが悪い 4 名、胃部の膨満感 2 名、胃部のむかつき感 2 名(重複回答あり)であった。また、便性状の変化(下痢、軟便など)も 14 名全員に認められた。なお、このうち 1 名は下痢や嘔吐の顕著な症状はなく軟便(排便は 1 日 1 回)で推移していた。その他として比較的共通にみられた症状は、倦怠感(11/14)、悪寒(10/14)、腹痛(8/14)(内訳：軽度 7 名、重度 1 名)、発熱(8/14)などであった。有症者のうち顕著な下痢、嘔吐の症状がみられなかった例は 7 名で、この 7 名の症状は胃部の症状(6 名)、関節痛(6 名)、倦怠感(6 名)、軟便(5 名)、発熱(5 名)であった。

発熱時の体温は、48%が 37.5℃以下であった(図 2)。発熱日から 3 日間経時的に体温を測定していた有症者からの聞き取り調査の結果、2 日間程度で熱が下がる傾向がみられた(図 3)。

D. 考察

従来、使用していた食中毒の調査票は、胃部の症状について、「げっぷ」、「吐気」、

「嘔吐」が聞き取り項目になっていた。今回の調査では「吐気」が認められたのは有症者全体の54%にとどまった。一方、上記の項目よりも細かい胃部の症状を聞き取り項目に加えた結果、有症者全体の88%に胃部の何らかの症状が認められ、聞き取り項目が「吐気」のみの場合と比較し、より多くの有症者を把握することができた。また、この結果からノロウイルス感染の症状の特徴として何らかの胃部の異常が高頻度で起こることが推察された。

さらに胃部の異常とともに有症者に共通してみられたものとして便性状の変化があった。便の性状変化が認められた有症者のうち5名は軟便(1~3回/日)で推移し、顕著な下痢症状は認められなかった。この5名のうち1名は検便検査でノロウイルス陽性が確認されている(他の4名は検便検査未実施)。これらのことから軟便の場合でもノロウイルス感染の可能性を考慮する必要性が示唆された。

発熱時の体温は微熱傾向にあり、今回のような集団事例でない場合には、発熱以外の症状が軽いと、本人がノロウイルスに感染していることを自覚しにくいと考えられた。

以上のように、ノロウイルス感染における症状は、典型的な下痢、嘔吐、発熱だけでなく、軽症例を含め症状には多様性があることが示された。一方、これらの症状を、①胃部の異常、②便性状の変化、③倦怠感など、小さくくりでとらえるとそれらが高頻度で現れることが示唆された。これらのことから、従事者の健康チェックにおいては、①胃部の異常、②便性状の変化、③倦怠感など、幅広く症状を捉えるとともに、

それらの詳細についても把握することが重要であると考えられる。そのことにより食品取扱施設においてノロウイルス感染者の把握がよりの確に行われることになり、ノロウイルス食中毒予防に寄与すると考えられる。さらに、食中毒調査においても症状の詳細な聞き取りを行うことが、汚染要因の正確な把握に繋がるものと考えられる。

上述のように、現在多くの食品取扱施設での健康チェックや行政の食中毒調査票では下痢や嘔吐、発熱を健康チェック項目としており、この項目でのチェックでは軽症感染を含む非典型的な症状の感染例を把握することが困難であることに加え、それらの症状を呈した例は「不顕性感染者」として捉えられる可能性が考えられる。ノロウイルス感染における症状をより正確に把握するためにも、食品取扱施設の日常の健康チェックや行政の食中毒調査において症状の把握を詳細に実施することが重要と考えられる。

今回の調査結果から、ノロウイルス対策として、以下の健康チェック項目と対処が重要であると考えられた。

1. 下痢・嘔吐・発熱があった場合は出勤を控える。
2. 胃の不調、軟便程度の便性状の変化、微熱(平熱よりプラス0.5℃)、倦怠感などの症状があった場合は、以下に示す排便管理を行う。
3. 排便管理について
 - (1) 食品取扱い室等を汚染しないために職場のトイレで排便した場合は、速やかに上司に報告し、必要に応じて、食品を取り扱う作業に従事させない、帰宅させる、ノロ

ウイルスの検査を受けさせる等の適切な対応をとる。

(2) 使用したトイレは直ちに次亜塩素酸で消毒し、トイレが汚染源にならないように対処する。

(3) 症状がみられてから1週間程度は自宅のトイレでの排便を心がけ、十分な手洗いの励行、清潔な着衣に着替えるなどして出勤することで、食品取扱い施設に汚染を持ち込まない対策をとる。

E. 結論

ノロウイルス感染における症状は、軽症感染を含め、多様である。共通に認められる症状としては、胃部の異常、便性状の変化、倦怠感などで、それらを把握することがノロウイルス感染者の把握に重要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

平成27年度全国食品衛生監視員
研修会

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」
総合研究分担報告書(平成 28～30 年度)

ノロウイルスの排便後の拡散の実証実験とその対策

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 米山 朋那 (神奈川県厚木保健福祉事務所大和センター)
森口 真理子 (神奈川県衛生研究所)

研究要旨

現在のノロウイルス食中毒事件の多くは調理従事者からの食品の二次汚染が原因とされ、その汚染ルートとしてトイレでの手指や作業着への汚染が要因であると推定されている。長野県が行った実験では、洋式トイレで下痢便をした場合に便器から跳ね返った飛沫が臀部全体に付着することが示されている。また、肛門部の清拭をした場合トイレットペーパーだけではなく、臀部に付着した飛沫は母指球部分や服の袖口にも移行することが明らかになっている。そこで、本研究では排便後に手指や臀部が汚染された場合、その後どのように汚染が拡大していくのか実証実験を行った。また、トイレ使用時における手袋の着用が、二次汚染防止に有効であるかを検証した。その結果、手指が汚染された後、トイレットペーパーで肛門部を清拭し、衣服を整えた際に作業着に汚染が起こった。また、作業着(上着)を脱いでからトイレを使用した場合、下着が汚染された。臀部に汚染があった場合、下着に浸透し下着表面に移行することが示された。手袋の装着は、肛門の清拭や身支度を整えることによる二次汚染の防止に有用であった。これらの結果を基に、汚染防止対策を検討した。

A. 研究目的

厚生労働省の平成 28 年のノロウイルス食中毒事件の分析¹⁾によれば、ノロウイルスの感染者(不顕性感染者を含む)から食品が汚染されたと推定される事例が全体の 80%を占めている。調理従事者から食品が汚染されるルートとしてトイレでの手指や衣類等への汚染が要因として推定されている。長野県が行った実験²⁾では、洋式トイレで下痢便をした場合に、便器から跳ね返った水滴や飛沫が臀部全体に付着することが示されている。また、肛門部の清拭をし

た場合トイレットペーパーだけではなく、臀部に付着した飛沫は母指球部分や衣服の袖口にも移行することが示されている。

そこで、本研究では、排便後に肛門部を清拭した場合の手の汚染状況を再現し、その後どのように汚染が拡大していくのか実証実験を行った。また、肛門部の清拭の際に拭き残した左側臀部(右利きの場合)の飛沫が下着にどのように浸透するかの実験を行った。さらに、トイレ使用時における手袋の着用が手指や衣服への二次汚染防止に有効であるかを検討した。

B. 研究方法

すべての実験は、手にラテックスの手袋を装着して行った。これは汚染させた色素の除去などを容易に行うために便宜的に行ったものである。ただし、手袋を二重に重ねた実験 3 において、2 枚目の手袋着用は実際にトイレにおける二次汚染防止対策のための手袋の着用を想定したものである。

実験 1

(1) 長野県の実験²⁾を参考にし、下痢便時の臀部への飛沫の跳ね返り状況とこの状態で肛門部を清拭した手の汚染状態を青色のジェルネイル（マニキュア的一种で紫外線により硬化する爪化粧剤）を用いて再現した（写真1）。再現した手の状態のまま、再度、トイレトペーパーで肛門部を清拭し、衣服を整えた際の作業着の汚染状況を確認した。

(2) 作業着の上着を脱いでからトイレを使用した場合の下着の汚染を確認した。

実験 2

臀部に食品用ラップフィルムを巻き付けその上から青色のジェルネイルで下痢便の跳ね返りを再現した。その状態でラップの上から下着（トランクス）を履きジェルネイルの浸透状況を確認した。

実験 3

手袋を二重に装着し、実験 1 と同様に手の汚染状態を再現し、肛門を清拭した。その後慎重に外側の手袋を外し身支度を整えた。この際の作業着の汚染状況を確認した。

C. 研究結果

実験 1

(1) 手指の汚染に見立てた青色ジェルネイルは、身支度を整える際に作業着のズボン右側面から背面、上着の右腹部に付着していた（写真2～4）。

(2) (1)と同様に身支度を整えた場合、作業着のズボン右側から背面、下着（シャツ）の右腹部に汚染が認められた。下着（トランクス）右側面のゴムの部分及び下着（トランクス）背面にも汚染があることが確認された（写真5～6）。

(3) 汚染された作業着を着用し調理台の前に立ち汚染位置を確認した。その結果作業着の汚染位置が調理台に近接していることが分かった（写真7）。

実験 2

左側の臀部に塗布した青色ジェルネイルは下着（トランクス）に速やかに浸透し、下着の表面にあらわれた（写真8～9）。

実験 3

ラテックスの手袋をはめて身支度前に手袋を慎重に外して、身支度を整えたところ、作業着等への汚染拡大はみられなかった（写真10～11）。

D. 考察

ノロウイルス食中毒の患者数は全食中毒事件の半数以上を占めている。その多くは調理従事者からの食品の二次汚染が原因と推定されている。その主な発生要因は感染者の嘔吐物や便の接触であり、特にトイレでの手指や衣類などへの汚染が汚染ルートとして重要であると考えられている。横浜市の調査³⁾では、市内の大規模調理施設 194 施設で作業着を脱がないでトイレを使用している施設は 40%となっている。また、多くの食品取扱い施設は、学校

給食の管理要領⁴⁾で示されているような便器の前に手洗い設備があり身支度を整える前に手を洗える構造にはなっていない。今回の実験において作業着の腹部から下着の腹部に付着した汚染はその位置や青色ジェルネイルの濃淡から母指球の汚れに由来すると考えられた。この結果から排便後に肛門部を清拭し身支度を整える際に手を介して、衣服（下着を含む）に汚染が拡大する危険性があることが示唆された。さらに、トイレトペーパーで拭き取れなかった臀部の跳ね返りは下着の表面に浸透する可能性があることが分かった。これらのことから、感染者がトイレで排便した場合、ノロウイルスの汚染を防ぐことは極めて困難であると考えられる。このことから、食品取り扱い施設内においてトイレを使用する場合には、作業着の脱衣、靴の履き替え、手洗いの励行だけでは十分とは言えないと思われる。食品取り扱い施設において下痢などの症状がみられたら、まず、ノロウイルスによる胃腸炎である可能性を疑い、みずからが汚染を起こさないための対応を心がけることが重要である。致し方なく、下痢時に食品取り扱い施設内のトイレを使用する時は、可能な限り汚染防止に注意を払い排便し、用便後は、最大限に念入りな手洗いを心がけるとともに、作業着等が汚染した可能性がある場合などは、衣類を交換する。さらに、下痢をしたことを、施設の責任者に報告し、責任者は従業員が下痢をした場合、当該従業員に対し食品取り扱い作業の従事制限、ノロウイルス感染によるか否かの確認（医療機関等の受診）など適切な指導を行うとともに、トイレの清掃・消毒を速やかに実施するな

どの汚染防止対策を徹底することが肝要である。

一方、実験3で手袋を二重にして肛門清拭後、外側の1枚を外し、身支度を整えたところ、衣服への汚染は見られなかった。手袋をしたとしても清拭しきれなかった臀部全体の跳ね返り汚染の浸透を防ぐことはできないが、作業着への濃厚な汚染を避ける一つの方策と考えられた。

E. 結論

今回の実験からノロウイルスに感染している従事者がトイレで排便した場合、作業着の汚染を介して食品取扱室にウイルスを持ち込む可能性があることが示唆された。特に便が一気に勢いよく出る、下痢便、軟便時は臀部に飛沫が跳ね返ることからその危険は大きくなると考えられる。手袋を着用してのトイレの利用は、作業着等への汚染防止の手段として有用である。

参考文献

1. 平成29年3月26日開催の薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会食中毒部会資料3
2. 高野徳高:長野県北信保健福祉事務所「トイレを起点とするノロウイルス汚染の拡大の検証」平成23年度全国食品衛生監視員研修会研究発表等抄録
3. 山本祥子:横浜市保健所食品衛生課食品衛生専門監視班「食品取扱者が着用するユニフォームの衛生点検について」平成27年度全国食品衛生監視員研修会研究発表等抄録
4. 文部科学省スポーツ青少年局学校健康教育課「学校給食調理従事者研修マニ

ュアル」

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

平成 29 年度全国食品衛生監視員研修
会

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

写真1：長野県の実験を参考にし、排便後の手の汚染を再現した。



写真4：作業着上着背面右下 裏面に汚染が認められた。

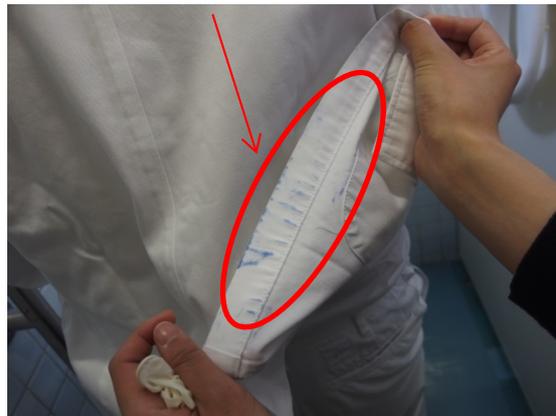


写真2：作業着の上着前面右下の表面に汚染が認められた。



写真5：下着（シャツ）の前面右の表面に汚染が認められた。



写真3：作業着の上着右側面下の表面に汚染が認められた。



写真6：下着トランクス背面右側の表面に汚染が認められた。



写真7：汚染された作業着を着て調理時の調理台と汚染部位の位置関係を確認した



写真10：二重に装着した手袋を上の手袋だけ慎重に外した。

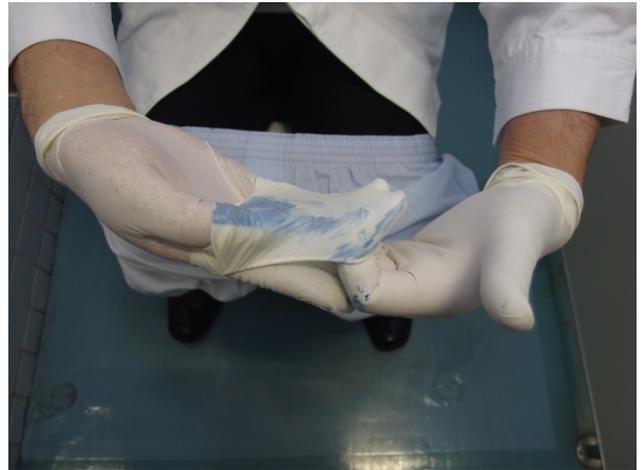


写真8：長野県の実験を参考にし、下痢便時の便の跳ね返りの臀部の状態を再現した。



写真11：着衣の汚染はみられなかった



写真9：臀部の汚れが下着（トランクス）に浸透した。



食中毒事例の原因食品中および汚染の原因となった感染者糞便中の ウイルス量の推定

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

研究要旨

2017 年 1 月に和歌山県御坊市で発生した磯和えによる集団食中毒事例において、原因食品とされる磯和えから real time PCR によりノロウイルス (NoV) 遺伝子が検出され、磯和えに含まれる NoV 遺伝子のコピー数は 1g あたり 125 コピーと推定された。本研究ではこの値を基に喫食されたウイルス量および汚染源と推定される感染者の糞便中のウイルス量の推定を行った。その結果、一人あたり磯和えを 50g 食べたと仮定すると、一人が 6,250 コピーの NoV を摂取したと考えられた。また、汚染が生じた磯和えが約 800 人分程度と仮定すると、本事例に提供された磯和え全体として 5×10^6 コピーの汚染があったと計算された。一方、汚染源と推定される海苔の刻み作業を行った感染者の便中のウイルス量は、約 10^9 /g 程度であったと推定された。

A. 研究目的

2017 年 1 月から 2 月にかけて和歌山県御坊市、東京都立川市および小平市などで発生した食中毒事件は、1つの海苔加工施設においてシート状の海苔を裁断機で刻む工程においてノロウイルス (NoV) に感染した作業員から汚染されたと推定される刻み海苔が原因食品であったことが示されている。この刻み海苔による分散型食中毒事件の発端となった和歌山県御坊市において、当所で原因食品として推定された学校給食の保存食について検査を実施した結果、磯和え 1 検体から NoV G

II. 17 遺伝子が検出された。Real time PCR で得られた定量値から磯和えに含まれる NoV 遺伝子のコピー数は 1g あたり 125 コピーと推定された。本研究では、この値を基に喫食されたウイルス量および汚染源と推定された刻み海苔作業員の糞便中のウイルス量の推定を行った。

B. 研究方法

磯和えの中に 10～20%海苔が含まれると仮定し、海苔 1g あたりの汚染量を推定した。

また、一人あたりの摂食量を 50g、汚染

が 1,000 食分と仮定し、磯和え全体の汚染ウイルス量を推定した。

さらに、一連の刻み海苔の汚染の原因となったと推定されるノロウイルス感染者の便中の感染性ウイルス量を推定した。

(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. 研究結果と考察

Real time PCR による定量結果から磯和えに含まれる NoV 遺伝子のコピー数は 1g あたり 125 コピーと計算されたので、磯和えの中に 10~20%海苔が含まれると仮定すると、刻み海苔 1g あたりの汚染量は 12.5~25 コピーと計算される。一人あたりの磯和えの喫食量を 50g と仮定すると、一人あたりの NoV の摂取量は 6,250 コピーと計算された。

一方、当該事例の患者数は 763 人と報告されていることから汚染が約 800 人分程度と仮定すると、本事例に提供された磯和え全体として 5×10^6 コピーの汚染があったと計算された。

次に、刻み海苔の汚染源となった感染者の糞便中のウイルス量の推定を試みた。刻み海苔が作業員から汚染を受けた時期は 2017 年 12 月下旬とされ、一連の食中毒事件の最後の発生は 2018 年 2 月 25 日の東京都小平市での食中毒であったことから、約 2 か月の間は刻み海苔に付着した NoV が感染性を保持していたことになる。我々の乾燥状態でのノロウイルスおよびネコカリシウイルスを用いた生存性試験の結果、生存性は条件によって異なるものの、生存性が高い条件では 2 か月生存性を保持するものの、感染価は約 1/1,000 に低下することが示されている。上述のように 1 月中旬の和歌山県御坊市での食中毒事件の原因となった磯和えに使用された刻み海苔に含まれる NoV コピー数は 1g あたり 12.5 から 25 コピーと計算されたことや宗村らの報告（食品衛生学雑誌, 58, 260-267, 2017）では 2 月中旬の東京都立川市での食中毒事件から検出された NoV の RNA コピー数は刻み海苔 1g あたり約 360~2,900 コピーと計算されていることなどから、2 月中旬の感染性を有する NoV の汚染量を刻み海苔 1g あたり 10~100 と仮定した。1 袋に含まれる刻み海苔の 100g あたりでは 100 倍量の $10^3 \sim 10^4$ (幾何平均値: 3.2×10^3) と計算される。海苔を刻み袋詰めした 12 月時点(汚染時)では、その 1,000 倍量の $10^6 \sim 10^7$ (平均値: 3.2×10^6) の感染性ウイルスが付着していたと計算される。汚染を受けた刻み海苔の袋の総数が 20~100 袋と仮定すると、汚染を受けた刻み海苔の全体に付着した感染性ウイルス量の総数は $2 \times 10^7 \sim 10^9$ (平均値: 1.4×10^8) と計算される。刻み海苔に付着した作業員の汚染物が便であり、刻み海苔を汚染した便の総量が 0.05g~0.5g と仮定した場合、便 1g 中に含まれていた感染性ウイルス量は、 $4 \times 10^7 \sim 2 \times 10^{10}$ (平均値: 8.9×10^8) と計算された。この約 $10^9/g$ という量は、NoV 患者の一般的な便中のウイルス量と考えられ、今回汚染の原因となったと推定される作業員の便中のウイルス量が特段多かつたわけではないと考えられた。

るものの、生存性が高い条件では 2 か月生存性を保持するものの、感染価は約 1/1,000 に低下することが示されている。上述のように 1 月中旬の和歌山県御坊市での食中毒事件の原因となった磯和えに使用された刻み海苔に含まれる NoV コピー数は 1g あたり 12.5 から 25 コピーと計算されたことや宗村らの報告（食品衛生学雑誌, 58, 260-267, 2017）では 2 月中旬の東京都立川市での食中毒事件から検出された NoV の RNA コピー数は刻み海苔 1g あたり約 360~2,900 コピーと計算されていることなどから、2 月中旬の感染性を有する NoV の汚染量を刻み海苔 1g あたり 10~100 と仮定した。1 袋に含まれる刻み海苔の 100g あたりでは 100 倍量の $10^3 \sim 10^4$ (幾何平均値: 3.2×10^3) と計算される。海苔を刻み袋詰めした 12 月時点(汚染時)では、その 1,000 倍量の $10^6 \sim 10^7$ (平均値: 3.2×10^6) の感染性ウイルスが付着していたと計算される。汚染を受けた刻み海苔の袋の総数が 20~100 袋と仮定すると、汚染を受けた刻み海苔の全体に付着した感染性ウイルス量の総数は $2 \times 10^7 \sim 10^9$ (平均値: 1.4×10^8) と計算される。刻み海苔に付着した作業員の汚染物が便であり、刻み海苔を汚染した便の総量が 0.05g~0.5g と仮定した場合、便 1g 中に含まれていた感染性ウイルス量は、 $4 \times 10^7 \sim 2 \times 10^{10}$ (平均値: 8.9×10^8) と計算された。この約 $10^9/g$ という量は、NoV 患者の一般的な便中のウイルス量と考えられ、今回汚染の原因となったと推定される作業員の便中のウイルス量が特段多かつたわけではないと考えられた。

E. 結論

2017年1月から2月に発生した刻み海苔関連ノロウイルス食中毒事件において摂取されたウイルス量および汚染源となった感染者の糞便中のウイルス量の推定を行った。御坊市での事例では一人が6,250コピーのNoVを摂取したと考えられた。汚染が約800人程度と仮定すると、全体として 5×10^6 コピーの汚染があったと推定された。海苔の刻み作業を行った感染者の便中のウイルス量は約 10^9 /gであったと推定された。

F. 研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表

永田 文宏, 上間 匡, 濱島 洋介, 寺杣 文男, 野田 衛: パンソルビントラップ法による食品からのノロウイルス遺伝子の検出, 第113回食品衛生学会学術講演会, 2017年, 江戸川区

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

表 1. 刻み海苔の汚染の原因となったと推定される患者便中のウイルス量の推定

	最小量	最大量	平均値
2月下旬の刻み海苔 1gあたりの感染性ウイルス数	10^1	10^2	3.2×10^1
2月下旬の刻み海苔 100gあたりの感染性ウイルス数	10^3	10^4	3.2×10^3
汚染時(12月下旬)の感染性ウイルス数	10^6	10^7	3.2×10^6
汚染した袋を20袋から100袋とした場合の、刻みの海苔に汚染した感染性ウイルス数の総数	2×10^7	10^9	1.4×10^8
刻み海苔に付着した便の総量を0.05gから0.5gとした場合の、感染者の便 1gに含まれる感染性ウイルス数	4×10^7	2.0×10^{10}	8.9×10^8

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」
総合研究分担報告書(平成 28～30 年度)

手洗いの実施状況に関する検証について

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

研究要旨

某大手食品取扱業者の協力を得て、手洗いが確実に実施されているか? 効果的な手洗いはどのような方法か等を調べた。その結果、ATP の値を手洗いの指標として用いることが可能であることが示唆された。また、各種手洗い洗剤の比較により、ATP 値と使用感の傾向は概ね一致していることが明らかになった。さらに、手洗いの検証を続けることにより、手洗いの改善傾向が認められた。これらのことから、手洗いに関して何らかの形で着実に実施されていることを検証することが重要であると考えられた。

A. 研究目的

近年のノロウイルス食中毒は食品取扱者からの二次汚染を受けた食中毒が多くを占めている。その予防を含め、食品衛生管理の基本として手洗いの重要性については一般に広く認識されている。しかしながら、実際にどの程度キレイに洗えているのか、ハンドソープと逆性石鹼と水石けん等の薬剤による差はあるのか、検証されている事例は多くない。そこで、2015年1月から2017年3月までの某事業所から提供された手洗いに関連する検証事例について集計し、その結果について考察を加えたので報告する。

B. 研究方法

某事業所から提供を受けた下記の各項

目について集計した。

1. 手洗い前後の ATP 値の検証

逆性石けんを使用した場合の、手洗い前、手洗い後の ATP 値の変化を 11 名について調べた。手洗いの条件は、逆性石鹼 3%を用い、3 プッシュ手に取り、10 秒間もみ洗いした後、20 秒間すすぎを行った。

2. 各種手洗い洗剤の比較

2013 年 4 月に、各種手洗い洗剤の効果について比較を行った。手洗い洗剤は、①既存逆性石けん、②薬用ハンドウォッシュ PK10 倍希釈((株) N 製)、③ハンドソープ(D(株) 製)、④薬用ハンドウォッシュスーパーコンク 20 倍希釈液 ((株) N 製)の 4 種類を用いた。手洗いの方法は、通常使用している既存逆性石けんで最初

に手洗いを行った後、①から④の各手洗い洗剤で2回目の手洗いを行った。各手洗い洗剤について10名ずつ実施し、手洗い前、1回目あるいは2回目の手洗いの後のATP値を測定した。

3. 継続的な手洗いの効果

2015年1月から2017年3月まで、手洗い後のATP値を測定し、基準値を1,000RLU未満として、それ以上の値を示した場合、手洗いのやり直しを行い、再度測定を行った。やり直しは、2回までとした。性別、実施年別、月別、それぞれの傾向を調べた。

(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

1. 手洗い前後のATP値の検証

逆性石けんを用いた手洗いの前・後におけるATP値の変化を11名について調べた。11名全員、ATP値の減少が認められたが、減少率は94%~13%と幅があり、個人差が大きかった(図1)。11名中8名はATP値が60%以上減少したが、残りの3名は減少率が低く、手洗い後のATP値が500を越えたままであった。1名のATP値は手洗い前が1,936、手洗い後が1,687で、手洗いの効果がほとんど認められなかった。

2. 各種手洗い洗剤の比較

各種の手洗い洗剤(逆性石けん)を用いた手洗いの効果について、それぞれ10名

を対象にATP値を測定するとともに、手洗い洗剤の使用感について調査した。1回目の手洗い(既存の逆性石けん(水石けん)使用)後のATP値の10名の平均値は、値の低い順から②が383.2、③が585.2、①が730.2、④が907.8であった(表1、図2)。その後の①から④の各手洗い洗剤で2回目の手洗いを行った後のATP値の平均値は、②が159.6、③が216.7、①が295、④が486.7であった。各手洗い洗剤を使用した感想については、手洗い洗剤②では泡がなめらかななどの好意的な感想が多かった。手洗い洗剤③は泡立ちがよいなどの好意的な評価がある一方、すすぎにくいなどの欠点を指摘する意見も多くみられた。手洗い洗剤④は泡立ちが少ないなどの意見が多くみられた。以上のように、ATPの値を手洗いの指標として用いることが可能であることが示唆された。各種手洗い洗剤の比較により、ATP値と使用感の傾向は概ね一致した。

3. 継続的な手洗いの効果の検証

2年3か月にわたり手洗い効果についてATP値を指標に検証した。使用されていた手洗い洗剤の割合は図3のとおりである。手洗い後のATP値が高かった者は、手荒れ、傷、乾燥、アトピーなど、手指の状態があまりよくない(不健康)状態の者が多かった。手洗いのやり直しとなった者を性別にみると、女性が22.9%、男性が20.0%でやや女性の割合が多い傾向にあった(図4、表2)。実施年別で見ると、基準値以上の割合は2015年が3%、2016年が5%、2017年が3%で有意な差は認められなかったが、2016年6月までと7月以

降に区分してみると、手洗い後の ATP 値が基準値である 1,000 以上であった割合は前者が 5%(32/632)、後者が 0.9%(3/305)で手洗い効果が改善されているように見受けられた(図 5、表 3)。今後も継続的に調査を実施する必要があるものの、手洗いの検証を ATP 値を指標に継続することにより、手洗いの改善傾向が認められた。今回の結果は、一事業所での事例であるが、手洗いに関しては何らかの形で検証することが重要であると考えられる。

D. 結論

ATP の値を手洗いの指標として用いることが可能であることが示唆された。各種手洗い洗剤の比較により、ATP 値と使用感の傾向は概ね一致した。手洗いの検証を続けることにより、手洗いの改善傾向が認められ、検証の重要性が示唆された。

E. 研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表

F. 健康危険情報

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. 4種類の手洗い洗剤による洗浄効果（ATP 値）および使用感の比較

2 回目の 手洗いに 使用した 洗剤	被験者	ATP 値			使用感(コメント)
		洗浄前	A (1 回目の 洗浄後)	B (2 回目の 洗浄後)	
既存逆性石けん (水石けん) ①	1	699	561	204	
	2	341	216	80	
	3	527	512	274	
	4	1906	299	219	
	5	879	416	189	
	6	2496	923	594	
	7	255	49	27	
	8	763	367	224	
	9	10651	3513	854	
	10	1229	446	285	
	平均	1974.6	730.2	295	
手洗い洗剤 ②	1	959	795	165	泡なめらか
	2	849	505	56	従来品と変わりなし
	3	1490	710	250	クリーミー
	4	453	121	99	泡細かい
	5	12777	825	291	消毒臭い、すすぎ良い
	6	1017	210	67	良い感触
	7	6222	230	306	普通
	8	1224	260	192	特になし
	9	878	81	103	手になじむ
	10	842	95	67	泡が良い
	平均	2671.1	383.2	159.6	
手洗い洗剤 ③	1	1159	1656	755	泡柔らかい・気持ち良い
	2	751	610	166	泡立ち良い、すすぎにくい
	3	330	275	122	クリーミー
	4	6194	1628	300	泡なめらか
	5	775	199	39	泡立ちなめらか、流しにくい
	6	1380	278	175	泡なめらか、落ちにくい
	7	2875	273	136	泡なめらか
	8	3327	462	172	泡立ちよい
	9	825	277	122	泡普通、流しにくい
	10	313	194	180	泡なめらか、流しにくい
	平均	1792.9	585.2	216.7	
手洗い洗剤 ④	1	135	27	169	泡が少ない
	2	170	242	151	
	3	755	509	122	泡が少ない
	4	593	2089	1468	
	5	401	349	142	泡立ち少ない
	6	432	1010	538	あまり変わらない
	7	1000	2258	909	泡立ちよくない
	8	3904	1088	909	泡立ち少ない
	9	1061	909	242	泡が少ない
	10	735	597	217	泡はやわらかい
	平均	918.6	907.8	486.7	

A：最初の手洗い後の ATP 値(従来の逆性石けん鹼（水石けん）使用），B：A による手洗い後、「2 回目に使用した手洗い洗剤」で示した各手洗い洗剤（本文参照）で再度手洗いを実施した後の ATP 値

表 2. 手洗いでやり直しが指示された人数と手洗い後の ATP 値が 1,000 以上であった人数

		総数	男性	女性	性別不明
調査人数		937	421	481	35
やり直しが指示された人数		43	21	21	1
手洗い後の ATP 値が 1000 以上であった人数	(初回)	32	17	14	1
	(やり直し 1 回目)	14	7	6	1
	(やり直し 2 回目)	4	2	1	1

表 3. 月別の手洗い効果：手洗い後に ATP 値が 1,000 以上であった割合

調査年月		調査数	ATP1000 以上	割合(%)
2015 年	1 月	45	2	4
	2 月	36	0	0
	3 月	33	0	0
	4 月	37	0	0
	5 月	34	1	3
	6 月	41	0	0
	7 月	37	0	0
	8 月	31	3	10
	9 月	36	1	3
	10 月	34	1	3
	11 月	32	1	3
	12 月	33	4	12
2016 年	1 月	33	4	12
	2 月	33	3	9
	3 月	36	6	17
	4 月	35	1	3
	5 月	32	2	6
	6 月	34	3	9
	7 月	35	0	0
	8 月	30	0	0
	9 月	31	0	0
	10 月	34	0	0
	11 月	29	0	0
	12 月	30	0	0
2017 年	1 月	42	3	7
	2 月	37	0	0
	3 月	37	0	0