

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年度 総括・研究分担報告書

研究代表者 野田 衛

平成29(2017)年 3月

目 次

I. 総括研究報告

ウイルスを原因とする食品媒介性疾患の制御に関する研究

野田 衛 ----- 3

II. 研究分担報告

1. ウイルスの食品検査の精度管理

鈴木 達也 他 ----- 23

2. 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

斎藤 博之 他 ----- 57

3. 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

滝澤 剛則 他 ----- 71

4. 低温加熱によるノロウイルスの不活化

上間 匡 他 ----- 81

5. ノロウイルスの不活化に関する研究

上間 匡 他 ----- 87

6. 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

高木 隆弘 ----- 95

7. ノロウイルスの培養に関する研究

上間 匡 他 ----- 105

III. 研究協力報告

1. 北海道で発生した食中毒事例の分子疫学的解析

吉澄 志磨 他 ----- 109

2. 青森県における集団胃腸炎事例から検出されたノロウイルスの
分子疫学解析 (2013/14~2015/16 シーズン)

筒井 理華 他 ----- 117

3. 感染性胃腸炎集団発生におけるノロウイルス検出状況

佐藤 直人 他 ----- 123

4. 秋田県における二枚貝からのノロウイルス・サポウイルスの検出と
感染性胃腸炎患者からのノロウイルス・サポウイルスの検出状

秋野和華子 他 ----- 129

5. 流入下水から検出される水中病原ウイルス遺伝子の検出

植木 洋 他 ----- 137

6.	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	田村 務 他	-----	143
7.	東京都におけるノロウイルスを原因とした集団発生例での 遺伝子型の解析 (2013/14~15/16 シーズン)	宗村 佳子 他	-----	151
8.	食中毒及び感染症事例で検出されたノロウイルスの分子疫学解析	清水 智美 他	-----	155
9.	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	入谷 展弘 他	-----	163
10.	堺市における下水サンプルを用いたノロウイルス等の 腸管感染ウイルスの流行解析	三好 龍也 他	-----	173
11.	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	谷澤 由枝 他	-----	181
12.	カキからのノロウイルス検出について	山本美和子 他	-----	187
13.	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	小林 孝行 他	-----	195
IV.	研究成果の刊行に関する一覧		-----	201

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 年度 総括研究報告書

研究代表者 野田 衛

平成 29 (2017) 年 3 月

平成 28 年度厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)
「ウイルスを原因とする食品媒介性疾患の制御に関する研究」
総括研究報告

ウイルスを原因とする食品媒介性疾患の制御に関する研究

研究代表者 野田 衛 国立医薬品食品衛生研究所・食品衛生管理部 第四室長

研究要旨

ノロウイルス等のウイルスによる食品媒介性疾患の発生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して以下の研究を実施した。

1. 食中毒検査体制の強化に関する研究

10 機関を対象にノロウイルス定量検査の外部精度管理を実施した結果、概ね良好な結果が得られた。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 GII. 17 に対しても適用できることを確認した。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。食中毒事例の調理従事者および患者から検出されたノロウイルスの塩基配列は、RT-PCR の検出プライマー内の配列が一致する同一事例内の検体は、VP1 全長などより長い配列を用いて比較してもほぼ一致した。迅速簡便なふき取りからのウイルス検出法を開発した。カキからのノロウイルス検出においてアミラーゼ・アセトン法は簡便で、従来法と同等の感度であった。下水、患者、カキ等からのウイルスの検出と遺伝子解析を実施し、食品媒介ウイルスの流行状況を把握した。2015/16 シーズンは、GII. 4(Sydney2012), GII. 17, GII. 3 など、2016/17 シーズンは GII. 2 などが主要流行株であった。市販カキ等について検査したところ、カキ自体に加え、浮遊液からもノロウイルスが検出された。流入下水中のノロウイルス汚染量は感染性胃腸炎の患者数の増加より、早期に増加することが確認された。2016/17 シーズンに流行したノロウイルス GII. 2 は小児での流行が多い傾向にあった。これまで報告のないキメラウイルス GII. P16-GII. 4 Sydney_2012 が 2 事例確認された。CaCo-2 細胞や胆汁等を用いた NoV の分離培養法の検討を開始した。

2 調理従事者からの二次汚染防止に関する研究

水溶性高分子ポリマー化合物をコーティングした後、手洗いすることで、簡易な手洗いで効率的に汚染を除去することができた。冬季の公衆トイレはノロウイルスに汚染していることを実証した。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ヤ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。各種の電解水やファインバブルについてネコカリシヤ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。各種の消毒剤に対する不活化効果はウイルスや株により異なることが示されたことから、この結果を踏まえ、ガイドラインに示すウイルスや株の選定を行う予定である。

研究分担者		佐藤 直人	岩手県環境保健研究センター
斎藤 博之	秋田県健康環境センター		
	—	高橋 雅輝	同上
滝澤 剛則	富山県衛生研究所	梶田 弘子	同上
鈴木 達也	一般財団法人食品薬品安全センター	植木 洋	宮城県保健環境センター
高木 弘隆	国立感染症研究所	菅原 直子	同上
上間 匡	国立医薬品食品衛生研究所	田村 務	新潟県保健環境科学研究所
		新井 礼子	同上
研究協力者		宗村 佳子	東京都健康安全研究センター
中阪 聡亮	一般財団法人食品薬品安全センター	森 功次	同上
秋野 和華子	秋田県健康環境センター	永野 美由紀	同上
	—	木本 佳那	同上
佐藤 寛子	同上	小田 真悠子	同上
清水 優子	日本大学・医学部・微生物学教室	奥津 雄太	同上
		秋場 哲哉	同上
牛島 廣治	同上	清水 智美	川崎市健康安全研究所
名古屋 真弓	富山県衛生研究所	清水 英明	同上
稲崎 倫子	同上	入谷 展弘	大阪市立環境科学研究所
板持 雅恵	同上		
嶋 一世	同上	改田 厚	同上
長谷川 澄代	同上	阿部 仁一郎	同上
吉澄 志磨	北海道立衛生研究所	上林 大起	同上
後藤 明子	同上	山元 誠司	同上
大久保 和洋	同上	久保 英幸	同上
石田 勢津子	同上	三好 龍也	堺市衛生研究所
筒井 理華	青森県環境保健センター	内野 清子	同上
	—	中谷 誠宏	同上
坂 恭平	同上	岡山 文香	同上
菩提寺 誉子	同上	吉田 永祥	同上

小林 和夫	同上
谷澤 由枝	広島県立総合技術研究所保健環境センター
重本 直樹	同上
山本 美和子	広島市衛生研究所
則常 浩太	同上
藤井 慶樹	同上
八島 加八	同上
松室 信宏	同上
小林 孝行	福岡県保健環境研究所
吉富 秀亮	同上
芦塚 由紀	同上
中村 麻子	同上
梶原 淳睦	同上
小菅 大嗣	麻布大学
永田 宏文	国立医薬品食品衛生研究所
三元 昌美	同上

(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、遺伝子の変異を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。

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10機関を対象として、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。検査方法はあらかじめ指定した共通の方法とし、検量線作成用陽性コン

トロール溶液も共通とした。

(2) 食中毒調査等に係る検査法の開発・改良・評価

① パンソルビン・トラップ法を用いる際の RNA 検出系の最適化パンソルビン・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

一般食品からのウイルス検出法であるパンソルビン・トラップ法について、新しい変異株である GII.17 (GII.P17:GII.17) に対して本法が対応可能か検討した。

② 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。

③ 現行の遺伝子解析手法の評価

食中毒か感染症かの判断に有用とされている患者、調理従事者、食品等から検出されたノロウイルスの塩基配列の比較について、実際の食中毒事例等において検証した。

④ ふき取り検体からのウイルス検出法の改良

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。

⑤ カキからのウイルス検出法の改良

カキからのウイルス検出においてアセトン処理の有用性を調べた。

⑥ 市販ノロウイルス検出キットの評価

市販ノロウイルス検出キットについて遺伝子型ごとの検出率について比較した。

(3) 食品媒介ウイルスの食中毒事例、胃腸胃炎事例、下水および食品からの検出と遺伝子解析

富山県、宮城県、堺市、福岡県において定期的に下水からの食品媒介性ウイルスの検出を行い、患者からの検出ウイルスや感染性胃腸炎報告数と比較した。

北海道、青森県、岩手県、秋田県、東京都、川崎市において食中毒等の集団胃腸炎からのウイルスの検出と遺伝子解析を行い、流行ウイルスの性状把握を行った。

秋田県、広島市において、カキ等の二枚貝からノロウイルス等の検出と遺伝子型別を行い、ヒトから検出ウイルスと比較した。

(4) ノロウイルスの培養法の検討

ノロウイルスの培養に関する情報を整理し、CaCo-2細胞や胆汁等を用いた培養法に向けた基礎的実験を行った。

2. 調理従事者からの二次汚染防止に関する研究

(1) 低温加熱によるノロウイルスの不活化

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℃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。

(2) ノロウイルスの不活化

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。

(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。

(4) 効率的な手洗いの方法の検討

水溶性高分子ポリマーで手指をコーティングすることで、その後の汚染を簡易に除去できないか検討した。

(5) トイレの汚染リスク評価

トイレにおける感染リスクの基礎資料とするために、2016年10月～12月の間に、9つの公共施設内トイレについて、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。

(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

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。今後はより食品検体に近い調査試料を開発し、抽出工程のみならず、濃縮工程を含んだ外部精度管理調査を実施する必要がある。

(鈴木研究分担報告)

(2) 食中毒調査に係る検査法の開発・改良・評価

① パンソルビン・トラップ法を用いる際のRNA検出系の最適化パンソルビン・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

添加回収試験において、GII.17の回収率はGII.4のそれには及ばないものの、汚染濃度が低くなるにつれて高くなる傾向が認められた。低濃度領域の汚染を検出するために用いられるnested real-time PCRを用いた検討では、ポテトサラダと焼きそばにおいて、 35 コピー/gまで検出可能であり、すでに発表済のGII.4におけるものと同様であった。

(斎藤研究分担報告)

② 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。

(稲崎研究分担報告)

③ 現行の遺伝子解析手法の評価

北海道において、現在、通常の検査で患者や食品等からのノロウイルス遺伝子の検出に用いているPCRの増幅産物(RdRp領域:約290nt, RdRp-VP1領域:約340nt)の塩基配列が一致する検体は、より長い配列を用いて比較してもほぼ一致することが示された。

(吉澄研究協力報告)

青森県で2013/14~2015/16シーズンに発生したノロウイルス集団胃腸炎事例は49事例で、調理従事者が関与した食中毒事例は6事例であった。5事例の発症者便と調理従事者便等の塩基配列の相同性は100%で、1事例では1塩基異なる検体が見られた。

(筒井研究協力報告)

大阪市において、調理従事者からノロウイルスが検出された食中毒を対象に、調理従事者と患者の両者由来ノロウイルスの遺伝子解析を実施したところ、すべての事例において両者由来ノロウイルス

の遺伝子型、塩基配列が一致した。特に食中毒か感染症かの判断が困難な事例において、調理従事者由来ノロウイルスの遺伝子解析は有用であった。

(入谷研究協力報告)

④ ふき取り検体からのウイルス検出法の改良

ふき取りおよび再浮遊液に0.3%Zwittergent 加PBS(-)を用い、核酸抽出に供する試料の量を増やすことで、濃縮行程無しでも効率的にノロウイルスを検出することができた。

(谷澤研究協力報告)

⑤ カキからのウイルス検出法の改良

同一ロットのカキについて旧アミラーゼあるいは新アミラーゼで処理したPEG沈殿法と新アミラーゼとアセトンで処理した方法の実測値を比較したところ、法全体的にアミラーゼ・アセトン法が同等あるいは若干高い結果であった。

(山本研究協力報告)

⑥ 市販ノロウイルス検出キットの評価

比較した市販ノロウイルス検出キットにおいて、GII.4, GII.17は全てのキットで検出可能であったが、GII.2およびGII.6に対しては感度が不十分なキットがあることが示唆された。

(小林研究協力報告書)

(3) 食品媒介ウイルスの食中毒事例、胃腸胃炎事例、下水および食品からの検出と遺伝子解析

富山県において、2016年の感染性胃腸炎患者、下水流入水からウイルス検出を試みた結果、患者からはノロウイルス GII.4, GII.17, GII.2, サポウイルス GI.1 など、下水からはノロウイルス 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, 下水からノロウイルスGII. 4が, 集団発生事例と下水流からノロウイルスGII. 17が共通して検出された。11月～12月はノロウイルスGII. 2が主流であった。

(稲崎研究分担報告)

北海道において平成28年度に発生したノロウイルスによる集団胃腸炎は, 4～6月はGII. Pe_GII. 4 Sydney 2012, 11月以降はGII. P16_GII. 2が優勢であった。GII. P16_GII. 2の検出は感染症事例では主に低年齢層の事例(保育所・幼稚園, 小学校)で認められ, 12月以降は食中毒事例からの検出もGII. P16_GII. 2のみであった。

(吉澄研究協力報告)

青森県で2013/14～2015/16シーズンに発生したノロウイルス集団胃腸炎事例は49事例で, 調理従事者が関与した食中毒事例は6事例であった。5事例(事例番号23を除く)の発症者便と調理従事者便等の塩基配列の相同性は100%で, 1事例では1塩基異なる検体が見られた。

(筒井研究協力報告)

岩手県で2015/16シーズンに発生した集団発生事例38事例のうち36事例はノロウイルスによるもので, GII. 4(Sydney 2012)が12事例, GII. 17が11事例, GII. 3が9事例などであった。施設別では, 保育所が17事例, 高齢者施設5事例, 飲食店4事例などで, 保育所ではGII. 3, 食中毒事例ではGII. 17が多く検出された。

(佐藤研究協力報告)

秋田県で2016年1月購入生カキからGII. 3, GII. 17, GI. 2, GI. 4が, パック充

填の浮遊液からGII. 17, 2月購入生カキからGII. 4 Sydney 2012, GII. 17, GI. 2, GI. 4が, 3月購入アサリからGII. 6とGI. 7のノロウイルスが検出された。サポウイルスは陰性であった。10月, 11月, 12月に購入した生カキおよびアサリのうち12月のカキからGII. 2とGII. 3が, 11月と12月のアサリからGII. 2が, 12月のアサリからGI. 7のノロウイルスが検出された。また, 2016年の秋田県の食中毒3事例はすべてノロウイルスによるもので, 検出遺伝子型はGII. 4 Sydney 2012とGII. 17であった。集団感染事例ではGII. 2が最も多く, 感染症発生動向調査ではGII. 4 Sydney 2012が最も多く, 次いでGII. 2であった。

(秋野研究協力報告)

宮城県において, 流入下水について, ノロウイルスおよびサポウイルスの検出を試みた結果, 各ウイルス遺伝子は通年検出された。下水から検出された両ウイルスの遺伝子型は感染性胃腸炎患者から検出された遺伝子型と同じであった。また, 下水中のノロウイルス濃度は感染性胃腸炎患者報告数の増加よりも, 早期に上昇することが確認された。

(植木研究協力報告)

東京都において, 2013/14～15/16シーズンのノロウイルスによる集団発生例において, 2013/14シーズンではGII. 4が55.1%の事例から, 2014/15と2015/16シーズンではGII. 17がそれぞれ33.1%, 42.6%から検出され, 多くを占めた。85例のGII. 17について全長解析を行なったところ, 全てGII. P17-GII. 17であり, 8582例は系統樹上,

Hu/GII. P17-GII. 17/Kawasaki308/2015/J P (Kawasaki308 株) と同一のクラスターに属した。

(宗村研究協力報告)

川崎市において、2014年9月から2017年1月に集団事例から検出されたノロウイルスの遺伝子型は、2014/15シーズンではGII. 4 (23事例), GII. 17 (16事例), GI. 2 (8事例), 2015/16シーズンではGII. 17(14事例), GII. 4(11事例), 2016/17シーズンでは(集計時現在) GII. 2 (13事例) が主流であった。

(清水研究協力報告)

大阪市の集団胃腸炎2事例から、これまで報告のないキメラウイルス GII. P16-GII. 4 Sydney_2012 が確認されたが、今のところ、その発生は2事例のみである。2016年11月および12月に大阪市内の保育園や小学校においてノロウイルス GII. 2 事例が多発した。12月市販の生食用カキにノロウイルス汚染(33.3%)が認められ、その遺伝子型はGII. 2であった。

(入谷研究協力報告)

堺市において2014年~2016年の下水中のノロウイルス汚染量は感染性胃腸炎患者の報告数のピークと同時期にピークとなり、また報告数が多いほど定量値も大きくなった。臨床検体と下水検体から検出される遺伝子型に相関がみられた。A型肝炎患者の報告はなかったが、A型肝炎ウイルスが3か所から検出された。遺伝子解析の結果から少なくとも2系統の異なるA型肝炎ウイルスに分けられた。

(三好研究協力報告)

広島市で、2016/17シーズンに採取されたカキからノロウイルス GII. 17 のみが3ロットから検出され、Hu/GII/JP/2015/GII. P17-GII. 17/Kawasaki308 に近縁な株であった。ヒトからは、全国的に流行している GII. 2 が最も多く5株検出され、RdRp領域の解析ができた2株はいずれも GII. P16-GII. 2 であった。

(山本研究協力報告書)

福岡県において、2015/16シーズンの下水道流入水中のノロウイルス定量値は $10^6/L$ で推移し、例年と比較して少ない流行であった感染性胃腸炎報告数と相関が認められた。

(小林研究協力報告書)

(4) ノロウイルスの培養法の検討

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た。

2. 調理従事者からの二次汚染防止に関する研究

(1) 低温加熱によるノロウイルスの不活化

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℃一夜、50℃ 6時間、55℃ 2時間、60℃ 1時間、コクサッキーウイルスB5型では55℃ 一夜、60℃ 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。

(上間研究分担報告)

(2) 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）

(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。

（高木研究分担報告）

(4) 効率的な手洗いの方法の検討

3%カルボキシメチルセルロースの45%エタノール液（CMC液）や7%ポリエチレングリコール85%エタノール液（PEG液）により指をコーティングし、簡易な水洗いを行ったところ、墨汁の汚れを容易に落とすことができた。また、CMC液のコーティングにより、水流のみでノロウイルスの汚染を79%低減できた。また、PEG液のコーティングに加え指をこすすることで、ノロウイルスの汚染を87%洗い流すことができた。

（田村研究協力報告）

(5) トイレの汚染リスク評価

トイレのふき取り調査において、便座裏38検体中7検体、ペーパーホルダー36検体中1検体からノロウイルスが検出された。検出遺伝子型は、GII.2が5検体、GII.6、GII.7およびGII.17が各1検体から検出された。

（谷澤研究協力報告）

D. 考察

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

参加機関の評価を行うためXbar-R管理図を参考とした解析またはzスコア管理図を採用したが、より多くの検査機関が参加した場合に検査結果のばらつきが大きくなる可能性も否定できないことから、評価に用いる管理限界線の値について、経験則に基づいた一定の標準偏差を用いることも一案であると考えられた。

（鈴木研究分担報告）

(2) 食中毒調査に係る検査法の開発・改良・評価

① パンソルビン・トラップ法を用いる際のRNA検出系の最適化パンソルビン・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

ガンマグロブリンを捕捉抗体として用いるパンソルビン・トラップ法は、GII.17に対しても問題なく適用できることが示された。

（斎藤研究分担報告）

② 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。

③ 現行の遺伝子解析手法の評価

北海道における食中毒事例内の検体の比較においては、RT-PCR の検出用プライマー内の短い配列情報 (RdRp および VP1 領域の一部) を用いた結果が、その領域全体の一致・不一致の状況から大きくは逸脱しないと考えられた。

(吉澄研究協力報告)

青森県で、同一事例内で異なる塩基配列が検出された事例が 1 事例認められたが、原因としてシーケンサーの塩基配列の読み違い、遺伝学的な変異などが考えられた。引き続きデータを蓄積する必要がある。

(筒井研究協力報告)

④ ふき取り検体からのウイルス検出法の改良

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が、ふき取りおよび再浮遊液に 0.3% Zwittergent 加 PBS(-) を用い、核酸抽出量を増やすことで、濃縮行程無しでも効率的にノロウイルスが検出できた。迅速、簡便なふき取り検査法として有用と思われる。

(谷澤研究協力報告書)

⑤ カキからのウイルス検出法の改良

カキからのノロウイルス検出法として検討したアミラーゼ・アセトン法の検出感度は、従来法であるアミラーゼ・PEG 沈法と同等あるいは若干高く、検査時間の短縮が図れる等のメリットがある。

⑥ 市販ノロウイルス検出キットの評価

近年流行していない遺伝子型は検出キットにより検出でき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シーズンは特に反応性の評価を行う必要があると考えられた。

(小林研究協力報告書)

(3) 食品媒介ウイルスの食中毒事例、胃腸胃炎事例、下水および食品からの検出と遺伝子解析

ノロウイルスによる食中毒の発生は、ノロウイルスの流行状況や流行する遺伝子型の変化等により影響を受ける。そのため、流行ウイルスの検出動向について継続的に監視することが、食中毒予防に寄与する。食中毒事例等の集団発生や感染症発生動向調査などから検出されたノロウイルスの遺伝子型等を調べた。2013/14 シーズンは GII. 4 (東京都), 2014/15 シーズンは GII. 17 (東京都, 川崎市), GII. 4 (川崎市), GI. 2 (川崎市), 2015/16 シーズンは GII. 4 (Sydney 2012) (富山県, 北海道, 岩手県, 秋田), GII. 17 (富山県, 岩手県, 秋田, 東京都, 川崎市), GII. 3 (岩手県), GII. 4 (川崎市), 2016/17 シーズンは GII. 2 (富山県, 北海道, 秋田県, 川崎市, 大阪市) などが、主要流行遺伝子型であった。GII. 2 による感染症事例は主に低年齢層の事例であったが、食中毒事例からも多く検出された。

ノロウイルス等の食品媒介性ウイルスは糞便中に排出される。そのため、下水を継続的にモニタリングすることにより、顕性感染や不顕性感染を問わず、ヒトでの流行状況を迅速にモニタリングすることができる。また、下水中のウイルス汚染量をモニタリングすることにより、患者の発生動向よりも先に流行の増加を捉えることができる可能性もある。また、カキ等の二枚貝がノロウイルス等の汚染を受ける主な原因は下水であることから、下水中のウイルスのモニタリングはカキ等の二枚貝の汚染リスクを早期に探知し、汚染防止に寄与できる可能性がある。これらの背景から、我々は長期に渡り、下水のウイルス調査を継続している。今年、従来の富山県、堺市、福岡県に加えて、宮城県においても、下水の調査を実施した。これまでの調査と同様に下水中のノロウイルス汚染量は感染性胃腸炎患者の報告数のピークと同時期に、とピークとなり、また報告数が多いほど定量値も大きくなり、臨床検体と下水検体検出される遺伝子型に相関がみられた。さらに、宮城県において流入下水中のノロウイルス汚染量は感染性胃腸炎の患者数の増加より、早期に増加することが確認された。このことから、流入下水のノロウイルス汚染量を継続的に監視することにより、感染性胃腸炎の流行をの早期に探知することができるかの可能性が示された。一方、他の地域ではそのようなことは明確には確認されていない。引き続き調査を継続し、下水中のウイルス量と感染性胃腸炎の発生動向の関連性についてデータを蓄積する予定である。

堺市において下水からA型肝炎ウイルスが検出された、A型肝炎患者の報告はなかったが、遺伝子解析の結果から少なくとも2系統のA型肝炎ウイルスの感染があったと考えられた。また、このことは下水の汚染を受けるカキ等の二枚貝にA型肝炎ウイルスが汚染するリスクがあることを示唆している。

カキが関連する食中毒事例から検出されるノロウイルスの遺伝子型はGIが比較的多いなど、必ずしも、ヒトで流行している遺伝子型や二枚貝以外の食中毒事例や集団感染事例から検出される遺伝子型と一致するわけではない。そのため、二枚貝から検出されるノロウイルス遺伝子型とヒトから検出される遺伝子型に関するデータを蓄積することはカキ関連食中毒の予防や発生要因の解明に重要である。秋田県の調査では、カキとヒトから検出されたノロウイルスの遺伝子型に関連が認められた一方、広島市の調査ではヒトからは多様な遺伝子型が検出されたが、カキからはGII.17が多く検出されるなど両者に違いが認められた。一方、今回市販パック詰めカキの浮遊液からノロウイルスが検出された。このことは、調理時における汚染拡大の原因となり得る危険性を示唆しており、注意喚起を促すひとつのデータとして重要な結果であると考えられる。

(4) ノロウイルスの培養法の検討

ノロウイルスの培養に関する各種の論文を参考に、ノロウイルスの培養に関与する腸内細菌(*Enterobacter cloacae*)、胆汁等を準備した。現在、腸内細菌の添加、胆汁酸等の添加条件の検討を行い、

CaCo-2細胞での腸内環境の再現を試みているところである。

2. 調理従事者からの二次汚染防止に関する研究

(1) 低温加熱によるノロウイルスの不活化

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。

(上間研究分担報告書)

(2) ノロウイルスの不活化

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)

(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う予定である。

(高木研究分担報告)

(4) 効率的な手洗いの方法の検討

トイレの前に手指をコーティング剤で保護することで、トイレ後の手洗いにおいて、トイレ中のウイルス汚染を効率的に洗い流すことができる可能性が示唆された。

(田村研究協力報告)

(5) トイレの汚染リスク評価

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。

(谷澤研究協力報告)

E. 結論

1. 食中毒検査体制の強化に関する研究

- 10 機関を対象にノロウイルス定量検査の外部精度管理を実施した結果、概ね良好な結果が得られた。
- 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GII. 17に対しても適用できることを確認した。

- 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。
 - 食中毒事例の調理従事者および患者から検出されたノロウイルスの塩基配列は、RT-PCRの検出プライマー内の配列が一致する同一事例内の検体は、VP1全長などより長い配列を用いて比較してもほぼ一致した。
 - 同一事例内で異なる塩基配列が検出された事例が1事例認められたが、原因としてシーケンサーの塩基配列の読み違いの可能性が示唆された。
 - 迅速・簡便なふき取りの検査法を開発した。
 - カキからのノロウイルス検出においてアミラーゼ・アセトン法は、感度は従来法と同等であり、検査時間の短縮等のメリットがある。
 - 市販キットでGII.4とGII.17は全てのキットで検出可能であつが、GII.2およびGII.6に対しては検出感度に問題があることが示唆された。
 - 下水、患者、カキ等からのウイルスの検出と遺伝子解析を実施し、食品媒介ウイルスの流行状況を把握した。
 - 下水中のノロウイルス汚染量は感染性胃腸炎患者の発生動向と概ね一致し、報告数と下水中のノロウイルス定量値に相関性が見られた。臨床検体と下水検体から検出される遺伝子型にも関がみられた。
 - 流入下水中のノロウイルス汚染量は感染性胃腸炎の患者数の増加より、早期に増加することが確認された。
 - 下水3か所からA型肝炎ウイルス遺伝子が3検出され、検出ウイルスは遺伝子解析から少なくとも2系統に分けられた。
 - 市販カキ等について検査したところ、カキに加え、浮遊液からもノロウイルスが検出された。
 - 2016/17シーズンに流行したノロウイルスGII.2は小児での流行が多い傾向にあった。
 - 大阪市でこれまで報告のないキメラウイルスGII.P16-GII.4 Sydney_2012が確認された。
 - 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できた。
- ## 2. 調理従事者からの二次汚染防止に関する研究
- 水溶性高分子ポリマー化合物をコーティングした後、手洗いすることで、簡易な手洗いで効率的に汚染を除去することができた。
 - 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。
 - 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ヤ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。
 - 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。
- 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う予定である。

F. 健康危害情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) 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
- (2) 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
- (3) 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
- (4) 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)
- (5) 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)
- (6) 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)
- (7) Naoki Shigemoto, Yuri Hisatsune, Yasushi Toukubo, Yukie Tanizawa, Yukie Shimazu, Shinichi Takao, Tomoyuki Tanaka, Mamoru Noda, and Shinji Fukuda (2016) Detection of gastroenteritis viruses among pediatric patients in Hiroshima Prefecture, Japan, between 2006 and 2013 using multiplex reverse transcription PCR-based assays involving fluorescent dye-labeled primers., *J Med Virol*, in press
- (8) 吉富秀亮, 芦塚由紀, 野田衛: 2015年2月の市販カキから検出されたノロウイルス GII.17 の分子遺伝学的解析. 福岡県保健環境研究所年報第43号, 114-117, 2016

- (9) 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)
- (10) 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, 38(1):5-6(2017)
- (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) 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)
- (13) 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)
- foods by a PANtrap method. 第 11 回日中国際ウイルス学会, 2016, 観音寺
- (2) 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
- (3) 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
- (4) 芦塚由紀, 吉富秀亮, 中村麻子, 小林孝行, 濱崎光宏, 世良暢之, 梶原淳睦, 清水良平, 岡本健太郎, 友枝哲宏, 森 一也, 松尾寿子, 野田 衛 (2016) 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学術総会, 江戸川区, 9/15
- (5) 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
- (6) 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,

2. 学会発表

- (1) Hiroyuki Saito, Miho Toho, Mamoru Noda, Tomoyuki Tanaka: Noroviruses RNA detection in contaminated

- 第 57 回日本臨床ウイルス学会, 2016, 郡山
- (7) 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
- (8) 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
- (9) 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
- (10) 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-フェージ, 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
- (11) 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-フェージ検出法の検討, 第 37 回日本食品微生物学会学術総会, 江戸川区, 9/15
- (12) 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)
- (13) 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
- (14) 秋野和華子, 斎藤博之, 野田 衛 (2016) 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, 江戸川区, 9/15
- (15) 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
- (16) 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
- (17) 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
- (18) 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-フェージの遺伝子型別, 第 112 回日本食品衛生学会学術講演会, 函館市, 10/27
- (19) 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)

- (20) 谷澤由枝，重本直樹，高尾信一，
野田 衛 (2016)ふき取り検体から
のハイドロキシアパタイトによるノ
ロウイルスの濃縮法の検討，第 37 回
日本食品微生物学会学術総会，江戸
川区，9/15
- (21) 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 (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
- (22) 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

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

平成 28 年度厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)
「ウイルスを原因とする食品媒介性疾患の制御に関する研究」
研究分担報告

ウイルスの食品検査の精度管理

研究分担者	鈴木 達也	一般財団法人食品薬品安全センター
研究協力者	中阪 聡亮	一般財団法人食品薬品安全センター
	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
	吉澄 志磨	北海道立衛生研究所
	筒井 理華	青森県環境保健センター
	斎藤 博之	秋田県健康環境センター
	菅原 直子	宮城県保健環境センター
	宗村 佳子	東京都健康安全研究センター
	新井 礼子	新潟県保健環境科学研究所
	稲崎 倫子	富山県衛生研究所
	入谷 展弘	大阪市立環境科学研究所
	三好 龍也	堺市衛生研究所
	山本 美和子	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 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 10^1 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。また、参加機関の評価を行うため Xbar-R 管理図を参考とした解析または z-スコア管理図を採用したが、より多くの検査機関が参加した場合に検査結果のばらつきが大きくなる可能性も否定できないことから、評価に用いる管理限界線の値

について、経験則に基づいた一定の標準偏差を用いることも一案であると考
えられた。

A. 研究目的

食品検査はその食品の安全性を担保するためのひとつの手段であるが、この検査結果をもって市場への流通の可否を判定することとなるため、その結果の妥当性を明確にする必要がある。また、一定の基準で結果を判断するためには、どの検査機関で実施しても同等の検査結果が得られることが求められる。そのためにも結果の信頼性を確保する必要があり、食品検査については平成 9 年度より 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、共通検体を用いた外部精度管理調査を行うことにより、結果の再現性を得ること、ならびに得られた結果をもとに各検査機関の評価方法を確立することを目的とした。

B. 研究方法

1. 調査試料

調査試料は検査試料(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(10¹コピーおよび 10²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。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。なお、均質性確認試験結果は以下のとおりであった。高濃度検体:9.18×10⁴±5.81×10³コピー、低濃度検体:2.27×10³±2.77×10²コピー。

2. 外部精度管理調査の実施

協力機関である 10 機関を対象として、2016 年 7 月 5 日に国立医薬品食品衛生研究所より調査試料の発送を行った。なお、検査方法については、あらかじめ指定した共通の検査方法(QIAamp Viral RNA Mini キットを用いた RNA の抽出、DNase 処理、逆転写反応およびリアルタイム PCR の実施)とした(表 1)。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。あわせて、採用した検査方法(表 2)および検量線の情報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。各検査試料における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. 検量線の解析

これまでに実施した外部精度管理調査では、検量線の濃度範囲を 10^3 コピーから 10^6 コピーで作成していた。しかし、陽性判定を行う濃度が 10^1 コピー以上であることを考慮すると、上記の濃度範囲で検量線を設定した場合、検量線外での定量を行うこととなるため、正しい定量結果が得られているかについては不明である。そこで、既知濃度の標準 DNA 溶液 (10^1 コピーおよび 10^2 コピー) を用いて検量線の濃度範囲を 10^1 コピーまで拡張したときの相関係数について観察することとした。その結果、検量線のパターンは図 1 に示した 3 パターンに分類された。すなわち、2 回の繰り返し測定においてほぼ同等の Ct 値が得られる (A)、 10^2 コピー以上の濃度範囲ではほぼ同等の Ct 値が得られているが、 10^1 コピーにおいてわずかにばらつきが生じる (B)、および全濃度範囲において同様の傾向が得られているがわずかにずれが生じている (C) である。しかし、いずれのパターンにおいても検量線の相関係数は 10^3 以上の濃度範囲と比較して、

10^1 コピー以上に濃度範囲を拡大してもほぼ同等の相関係数が得られた。

2. 調査試料における Ct 値の解析

標準 DNA 溶液および検査試料の Ct 値について観察した。その結果、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 2)。

3. 調査試料における実測値の解析

実測値について観察したところ、標準 DNA 溶液および検査試料の実数解析での基本統計量は表 3 のとおりであった。また、ヒストグラムおよび正規確率プロットを図 3~5 に示した。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 6)。一方、対数解析についても同様に行い、基本統計量を表 4 に示した。また、各調査試料におけるヒストグラムおよび正規確率プロットを図 7~9 に示した。報告値の平均値についても実数解析の場合と同様、検査試料間で有意差は認められなかった。一方、標準 DNA 溶液における標準偏差は検査試料と比較すると明らかに小さかった。さらに、実数解析と対数解析における変動係数を比較したところ、実数解析のほうが明らかに変動係数は大きかった。

4. 調査試料における換算値の解析

検査試料の 1 mL あたりの換算値の実数解析および対数解析での基本統計量は表 5 および表 6 のとおりであった。実測値の場合と同様、報告値の平均値において検査試料間で有意差は認められなかった

(データには示していない)。

5. 外部精度管理調査の評価方法の検討

外部精度管理調査における最終的な目的は参加機関から提出された結果の評価を行うことである。そこで、上記の解析により得られた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 (図 11)、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 (代表例として検体 -1 の結果を図 13 に示した)。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 12、14~19)。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。

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、 10^3 コピー以上の濃度範囲で作成した検量線とほぼ同等の相関係数が得られた。ノロウイルス検査では 10^1 コピー以上で陽性と判定することから、仮に判定基準値付近の濃度で調査試料を作製した場合には、現行の外部精度管理調査では検量線の範囲外で定量する可能性を含むこととなる。そのため、 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、機関 H において全ての測定で Ct 値が他の検査機関と比較して高かったが、これは Th line の設定方法に基づく可能性が考えられた。なお、機関 H の定量値が他の検査機関と比較して低いということはなかったことから、本検査機関においては Ct 値が高いことが定量結果に与える影響はないものと考えられた。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。これにより、各調査試料について解析を行ったところ、対数解析では標準 DNA 溶液における 1 機関を除いて、各検査機関において正しく検査が実施されているものと考えられた。しかし、今回得られた結果は、ある意味、エキスパート実験室で得られた結果であることから、他の検査機関が本外部精度管理調査に参加した場

合に、同様の結果が得られない可能性も考えられる。そこで、これらエキスパート実験室で得られた標準偏差を一定の判断基準として採用することが可能か、すなわち経験則に基づいた 1 組の管理限界線を設定することでの評価方法を採用することが可能なのかについて検討することとした。その結果、検査試料については標準偏差を 0.3~0.4 とすることで、高濃度検体、低濃度検体のいずれにおいても今回の z-スコア管理図と同等の評価を 1 組の管理限界線で行うことが可能であった (図 20、21)。これに対して標準 DNA 溶液では高濃度域において 0.1 程度でも十分に評価ができる可能性が示唆された。一般的に統計解析により得られる標準偏差は参加機関から回収された結果により変動するため、ばらつきが非常に大きくなる可能性を含んでいる。そのため、一定の許容範囲を設定することは目標値としての管理を行うことも可能となることから、判断基準が明確になるというメリットがある。しかし、ばらつきは採用する調査試料の基材によっても異なることから、これにより許容範囲を設定する場合には、より多くの調査試料を作製することで検証を進める必要があると考えられる。

E. 結論

ノロウイルス GII 陽性または陰性の検査試料、合計 7 種と標準 DNA 溶液を調査試料として採用した外部精度管理調査を 10 機関を対象に実施した。その結果、検量線の濃度範囲を 10^1 コピーまで拡張することによっても 10^3 コピー以上の場合

と同等の相関係数を示した。また、調査試料についてはいずれの検査機関も陽性または陰性を正しく報告しており、かつ同一濃度の 3 本についても同様の検査結果が得られた。また、z-スコアおよび Xbar-R 管理図を参考とした評価を行ったところ、1 機関において標準 DNA 溶液で高めの値を報告したが、これ以外では正しく検査が実施されているものと判断した。さらに、Xbar-R 管理図における許容範囲を設定するため、一定の標準偏差を採用したときの外れ機関の発生について観察したところ、検査試料では 0.3~0.4 とした場合に、今回の z-スコアにおける評価と同等の結果を得ることができた。今後はより食品検体に近い調査試料を開発し、抽出工程のみならず、濃縮工程を含んだ外部精度管理調査を実施する必要がある

ものと考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表

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

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

表1 指定した検査方法の詳細

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

表2-1 各検査機関における検査方法の詳細(1/2)

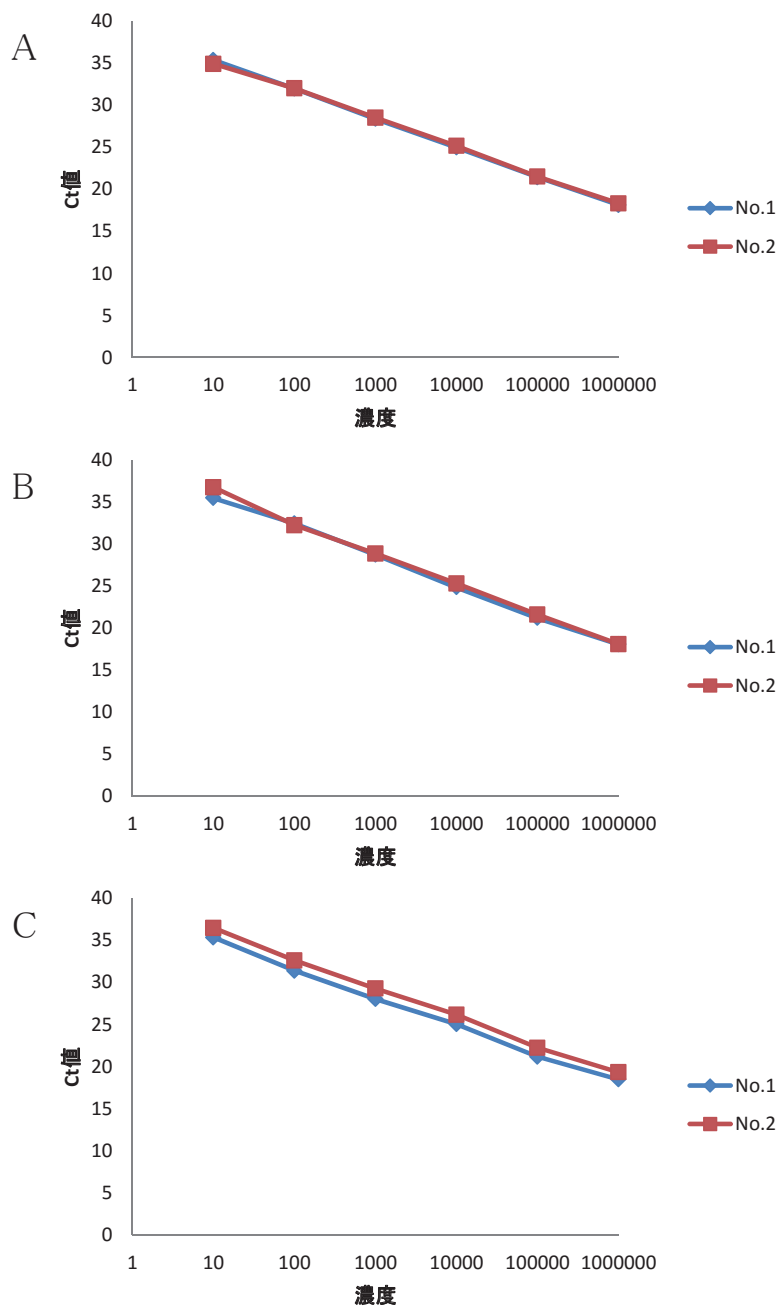
RNA抽出	機関A QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, 52904)	機関B QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, 52904)	機関C QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, 52904)	機関D QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, 52904)	機関E QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, 52904)
RNA抽出キット	QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, 52904)	QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, 52904)	QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, 52904)	QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, 52904)	QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, 52904)
Dnase処理	Recombinant DNase I (タカラ, No. 2270A) 5×First-Strand Buffer: Super Script II RNase H- Reverse Transcriptase (life technologies, 18064-01)に添付 Applied Biosystems® GeneAmp® PCR System 9700	Deoxyribonuclease(RT Grade) (ニッポンジーン, No.313-03161) 5×First-Strand Buffer: Super Script II RNase H- Reverse Transcriptase (life technologies, 18064-01)に添付 BT-23 (ヤマト科学株式会社)	Recombinant DNase I (タカラ, No. 2270A) 5×First-Strand Buffer: Super Script II RNase H- Reverse Transcriptase (life technologies, 18064-01)に添付 ABI2720	Recombinant DNase I (タカラ, No. 2270A) 5×First-Strand Buffer: Super Script II RNase H- Reverse Transcriptase (life technologies, 18064-01)に添付 TakaRa PCR Thermal Cycler Dice TP600 (タカラバイオ)	Recombinant DNase I (タカラ, No. 2270A) 5×First-Strand Buffer: Super Script II RNase H- Reverse Transcriptase (life technologies, 18064-01)に添付 Astec PC-805
逆転写酵素	Super-Script II RNase H- Reverse Transcriptase (life technologies, 18064-014)	Super-Script II RNase H- Reverse Transcriptase (life technologies, 18064-014)	Super-Script II RNase H- Reverse Transcriptase (life technologies, 18064-014)	Super-Script II RNase H- Reverse Transcriptase (life technologies, 18064-014)	Super-Script II RNase H- Reverse Transcriptase (life technologies, 18064-014)
反応バッファ	反応用バッファ(5× SSII Buffer)および100mM DTT	反応用バッファ(5× SSII Buffer)および100mM DTT	反応用バッファ(5× SSII Buffer)および100mM DTT	反応用バッファ(5× SSII Buffer)および100mM DTT	反応用バッファ(5× SSII Buffer)および100mM DTT
RNAseインヒビター	Recombinant Ribonuclease Inhibitor (タカラ, 2313A)	Recombinant Ribonuclease Inhibitor (タカラ, 2313A)	Recombinant Ribonuclease Inhibitor (タカラ, 2313A)	Recombinant Ribonuclease Inhibitor (タカラ, 2313A)	Recombinant Ribonuclease Inhibitor (タカラ, 2313A)
cdNTPs mix	10mM dNTPs mix (life technologies, 18427-013)	Deoxynucleotide (dNTP) Solution Mix (New England Biolabs, N0447S)	dNTPs mix (Roche#11814362001)	10mM dNTPs mix (life technologies, 18427-013)	2.5mM dNTPs mix (タカラ, SD0304)
プライマー	ランダムプライマー (invitrogen, N8080127)	ランダムプライマー (life technologies, 48190-011)	ランダムプライマー (Roche#11034731001)	ランダムプライマー (life technologies, 48190-011)	ランダムプライマー (タカラ, 3801)
装置	Applied Biosystems® GeneAmp® PCR System 9700	BT-23 (ヤマト科学株式会社)	ABI2720	TakaRa PCR Thermal Cycler Dice TP600 (タカラバイオ)	Astec PC-805
マスターミックス	Taq Man Universal Master Mix	LightCycler480 Probes Master (Roche Diagnostics)	Taq Man Universal Master Mix	Taq Man Universal Master Mix	Taq Man Universal Master Mix
COG2F	FASMAC	SIGMA genosys	SIGMA Genosys	フアスマック	Fasmac
ALPF	FASMAC	日本遺伝子研究所	フナコシ	フアスマック	Fasmac
COG2R	FASMAC	SIGMA genosys	SIGMA Genosys	フアスマック	Fasmac
RINGZAL-TP	Applied Biosystems TaqMan(R) プローブ	Thermo Scientific	eurolife	life technologies	Applied Biosystems
リアルタイムPCR装置	7500(life technologies)	LightCycler480 (Roche Diagnostics)	7500(life technologies)	7500 Fast(life technologies)	7900(life technologies)

色つきのセルは各検査機関で変更した内容を示す

表2-2 各検査機関における検査方法の詳細(2/2)

	機関F	機関G	機関H	機関J
RNA抽出	RNA抽出キット QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, 52906)	QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, 52904)	QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, 52904)	QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, 52904)
Dnase処理	Dnase Recombinant DNase I (タカラ, No. 2270A)	Recombinant DNase I (タカラ, No. 2270A)	Recombinant DNase I (タカラ, No. 2270A)	Dnase I Amplificationgrade (invitrogen 18068015)
	Buffer 5 x First-Strand Buffer: Super Script II RNase H- Reverse Transcriptase (life technologies, 18064-01)に添付	5 x First-Strand Buffer: Super Script II RNase H- Reverse Transcriptase (life technologies, 18064-01)に添付	5 x First-Strand Buffer: Super Script II RNase H- Reverse Transcriptase (life technologies, 18064-01)に添付	5 x First-Strand Buffer: Super Script II RNase H- Reverse Transcriptase (life technologies, 18064-01)に添付
	装置 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems)	Mastercycler gradient (ependorf)	ASTEC PC 310	Applied Biosystems 2720サーマルサイクラー
逆転写反応	逆転写酵素 Super Script II RNase H- Reverse Transcriptase (life technologies, 18064-014); 反応バッファ 反応用バッファ(5 x SSII Buffer)および100mM DTT RNaseインヒビター Recombinant Ribonuclease Inhibitor (タカラ, 2313A) dNTPs mix 10mM dNTPs mix (life technologies, 18427-013) プライマー ランダムプライマー (life technologies, 48190-011)	Super Script II RNase H- Reverse Transcriptase (life technologies, 18064-014); 反応用バッファ(5 x SSII Buffer)および100mM DTT Recombinant Ribonuclease Inhibitor (タカラ, 2313A) 10mM dNTPs mix (life technologies, 18427-013) Random 6mers (タカラ, RR037A)	Super Script II RNase H- Reverse Transcriptase (life technologies, 18064-014); 反応用バッファ(5 x SSII Buffer)および100mM DTT Recombinant Ribonuclease Inhibitor (タカラ, 2313A) 10mM dNTPs mix (life technologies, 18427-013) ランダムプライマー (life technologies, 48190-011)	Super Script II RNase H- Reverse Transcriptase (life technologies, 18064-014); 反応用バッファ(5 x SSII Buffer)および100mM DTT RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor(invitrogen,10777019) 10mM dNTPs mix (life technologies, 18427-013) ランダムプライマー (life technologies, 48190-011)
	装置 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems)	Mastercycler gradient (ependorf)	ASTEC PC 310	Applied Biosystems 2720サーマルサイクラー
リアルタイムPCR	マスターミックス COG2F ALPF プライマー(合成受託会社) COG2R プローブ(合成受託会社) RING2AL-TP リアルタイムPCR装置	Taq Man Universal Master Mix Applied Biosystems Applied Biosystems Applied Biosystems Applied Biosystems 7500(life technologies)	Taq Man Universal Master Mix life technologies japan life technologies japan life technologies japan life technologies japan 7500(life technologies)	Taq Man Universal Master Mix invitrogen invitrogen invitrogen invitrogen Quant Studio 7 Flex (life technologies)

色つきのセルは各検査機関で変更した内容を示す



パターン	測定	10 ³ ~	10 ¹ ~
A	No.1	0.999387	0.99971
	No.2	0.998285	0.998847
B	No.1	0.995524	0.997554
	No.2	0.996831	0.998598
C	No.1	0.999729	0.999222
	No.2	0.999807	0.999873

図1 検量線のパターンと相関係数

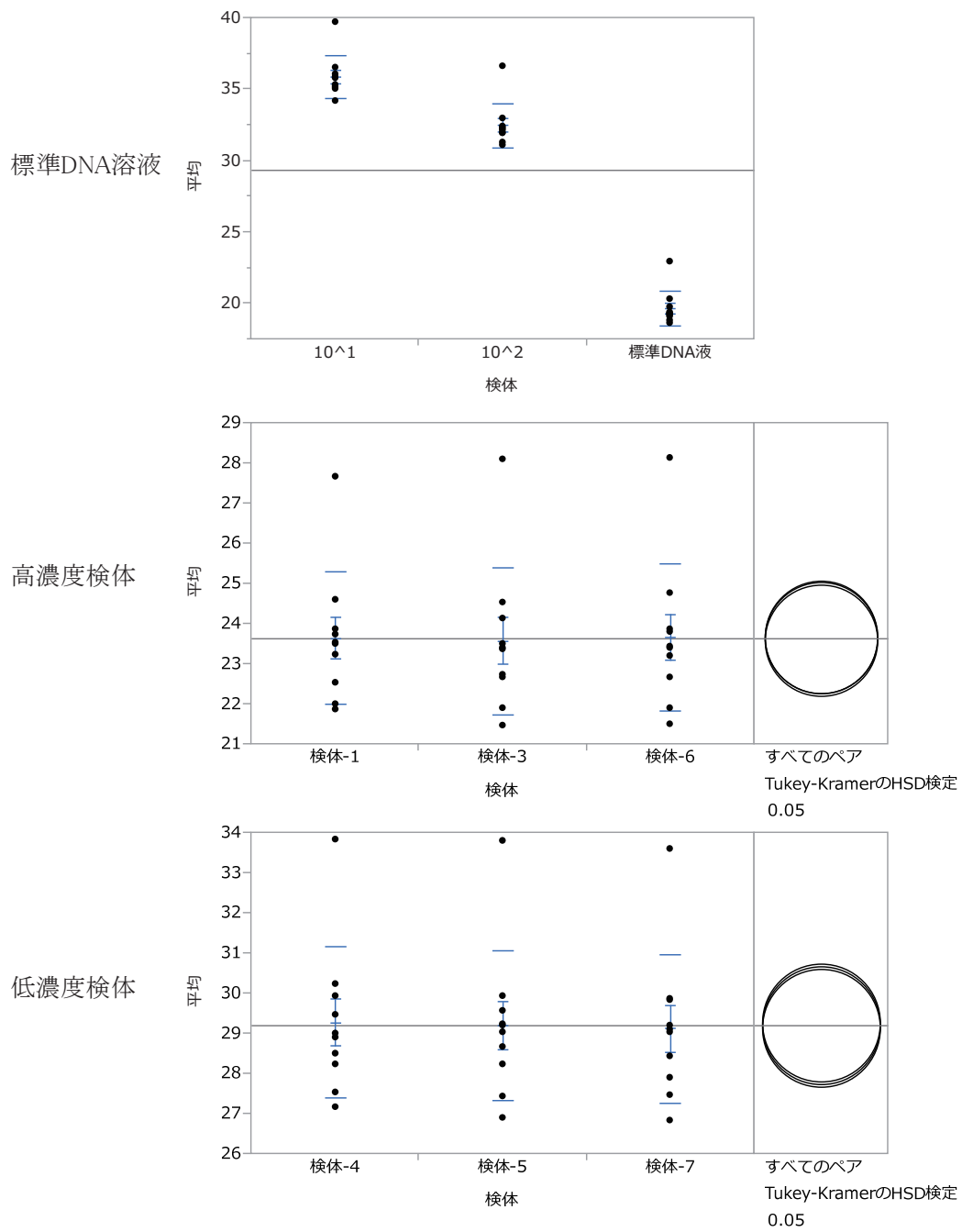


図2 調査試料におけるCt値
高濃度検体および低濃度検体における平均値の比較はTukey-KramerのHSD検定により行った。

表3 ノロウイルス検査の外部精度管理調査結果の概要（実測値：実数解析）

検体		平均値±標準偏差	変動係数
高濃度検体	検体-1	40571.896±19982.381	0.492518
	検体-3	43141.390±22365.800	0.518430
	検体-6	41130.337±21827.725	0.530696
低濃度検体	検体-4	1033.157±650.279	0.6294.9
	検体-5	1072.102±711.328	0.663489
	検体-7	1155.274±801.132	0.693456
標準DNA溶液	10 ¹ コピー	11.619±3.660	0.314965
	10 ² コピー	102.244±26.755	0.261680
	未知試料	513577.59±102564.15	0.199705

平均値、標準偏差の単位：コピー

表4 ノロウイルス検査の外部精度管理調査結果の概要（実測値：対数解析）

検体		平均値±標準偏差	変動係数
高濃度検体	検体-1	4.549849±0.235246	0.051704
	検体-3	4.570021±0.255461	0.055899
	検体-6	4.544060±0.257096	0.056578
低濃度検体	検体-4	2.926178±0.277427	0.094809
	検体-5	2.947285±0.259804	0.088150
	検体-7	2.969404±0.280289	0.094392
標準DNA溶液	10 ¹ コピー	1.037870±0.136416	0.131439
	10 ² コピー	1.997580±0.089564	0.044836
	未知試料	5.702405±0.075040	0.013159

平均値、標準偏差の単位：log（コピー）

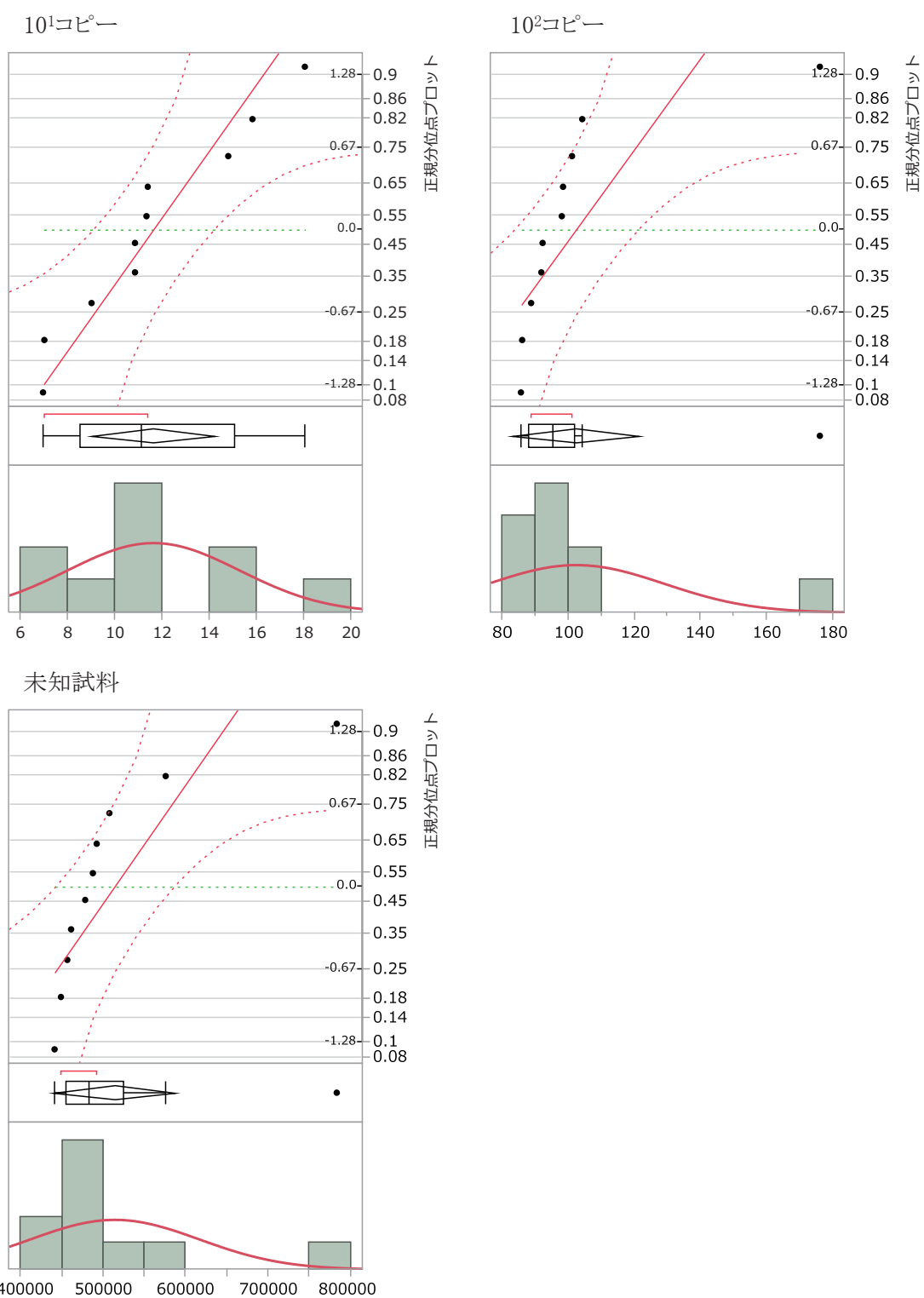


図3 標準DNA溶液におけるヒストグラムと正規確率プロット(実測値、実数解析)

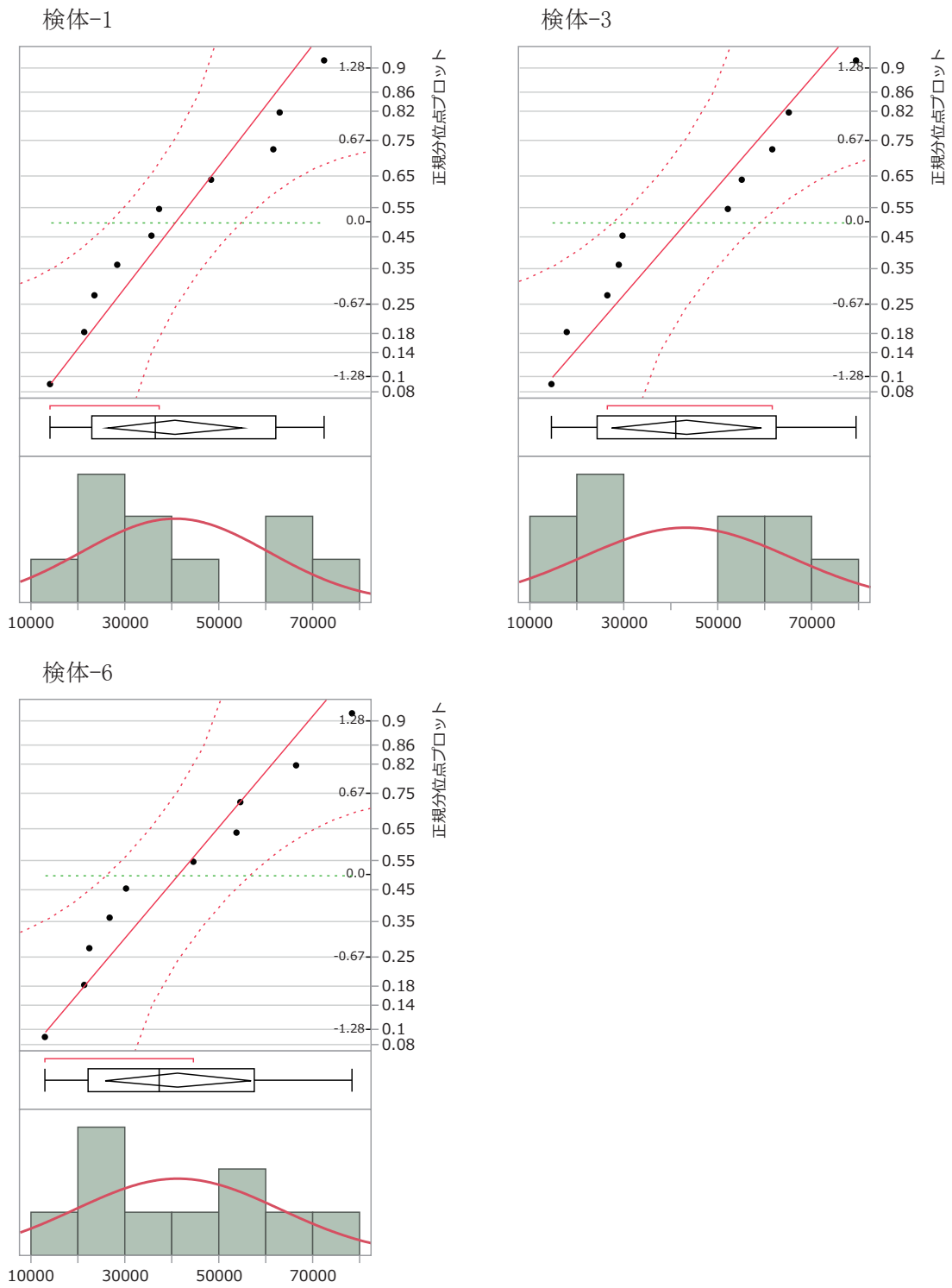


図4 高濃度検体におけるヒストグラムと正規確率プロット(実測値、実数解析)

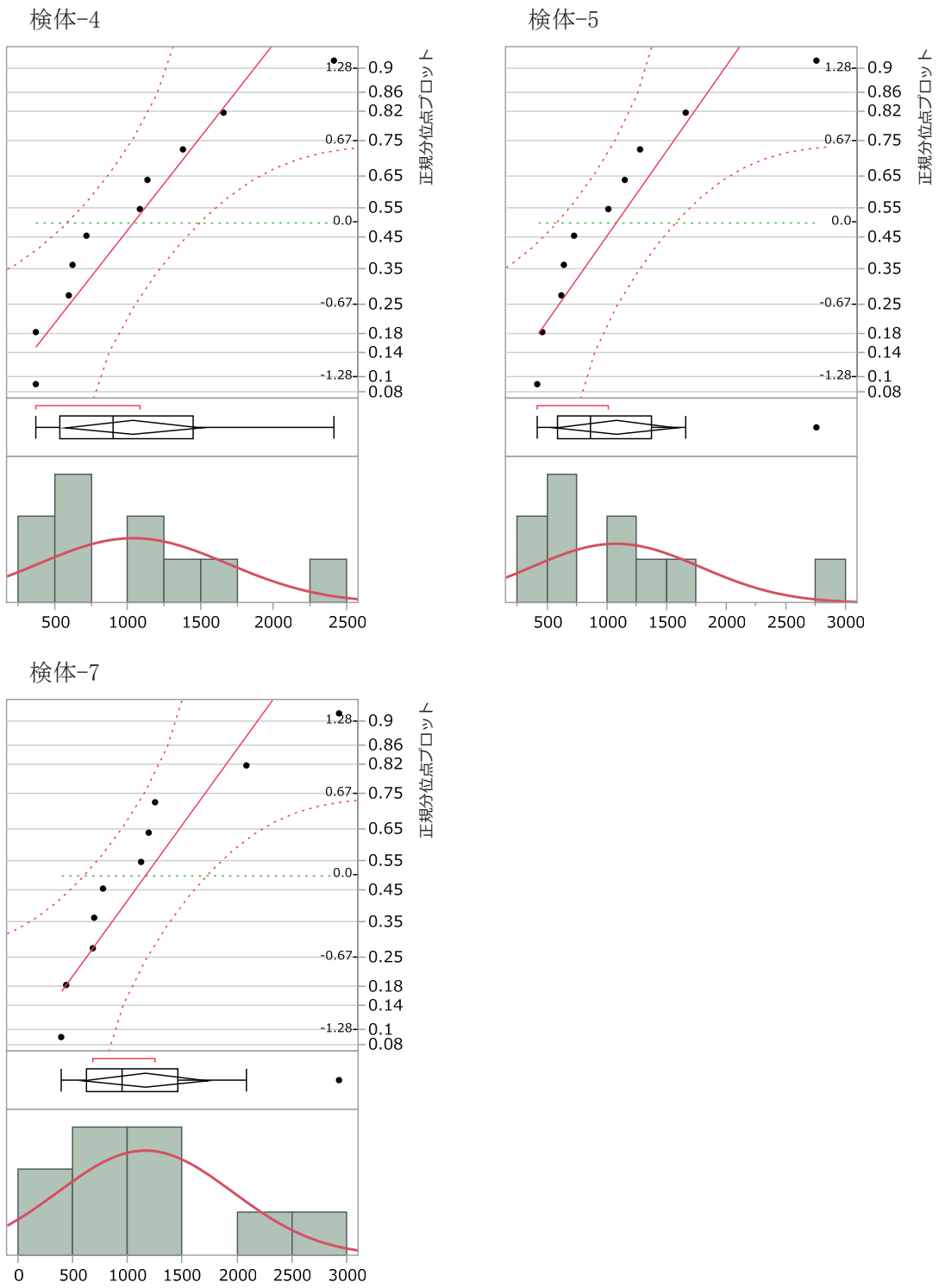


図5 低濃度検体におけるヒストグラムと正規確率プロット(実測値、実数解析)

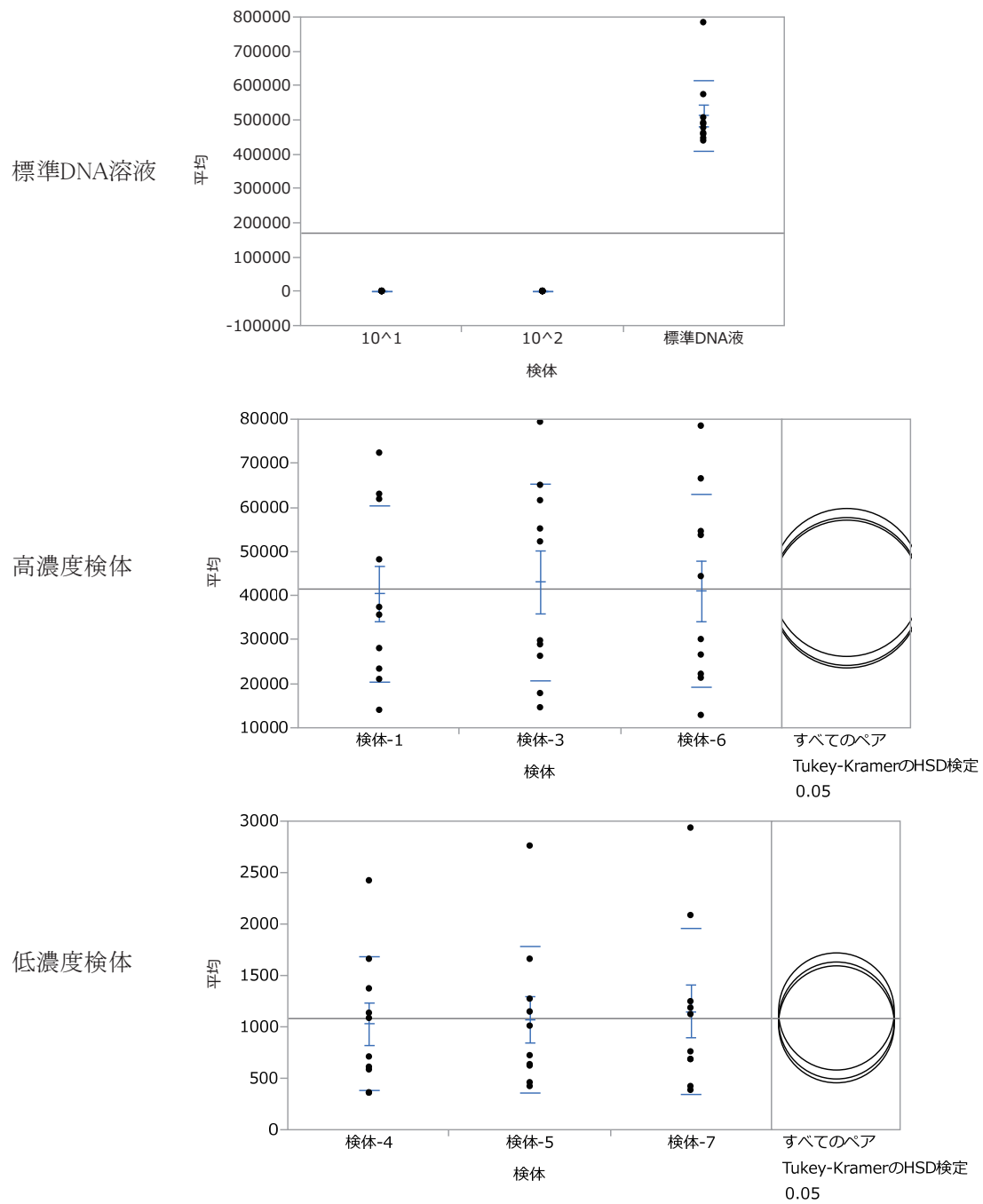
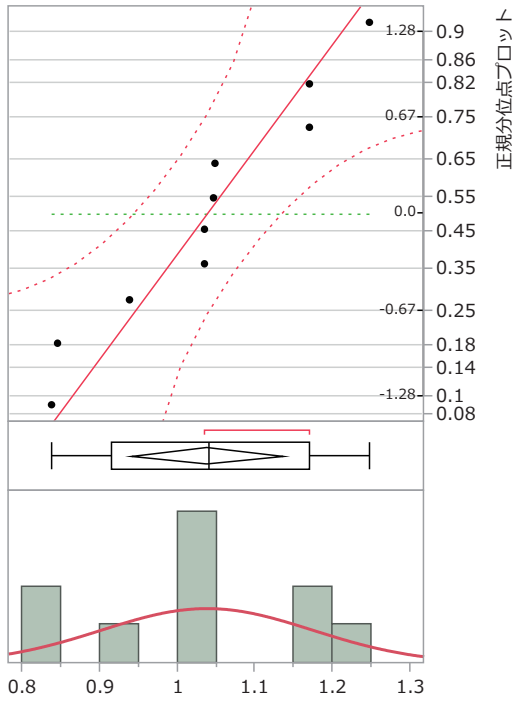
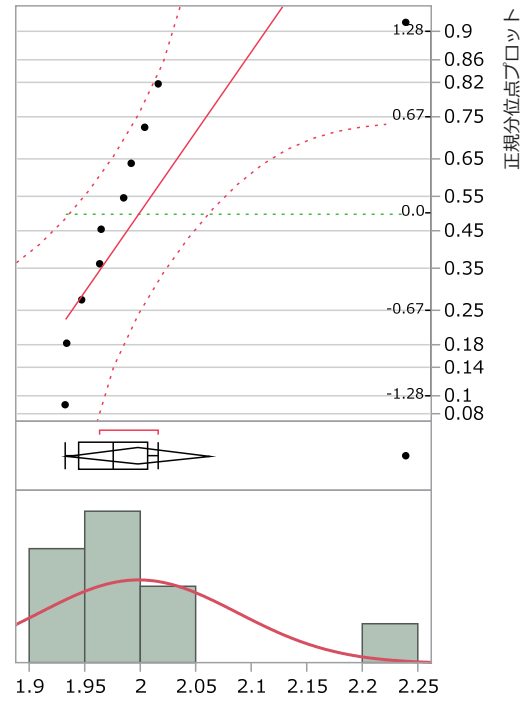


図6 調査試料における実測値(実測値、実数解析)
 高濃度検体および低濃度検体における平均値の比較はTukey-KramerのHSD検定により行った。

10¹コピー



10²コピー



未知試料

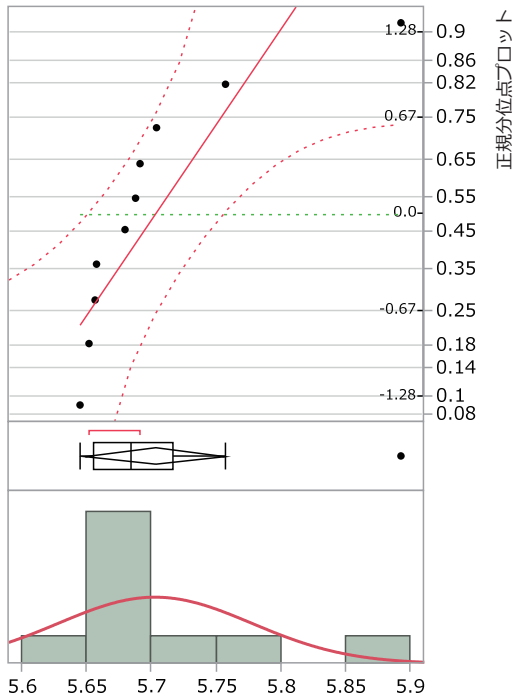
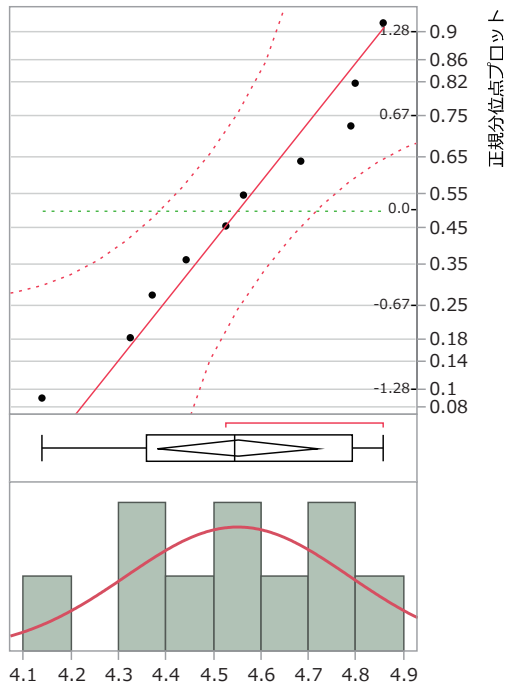
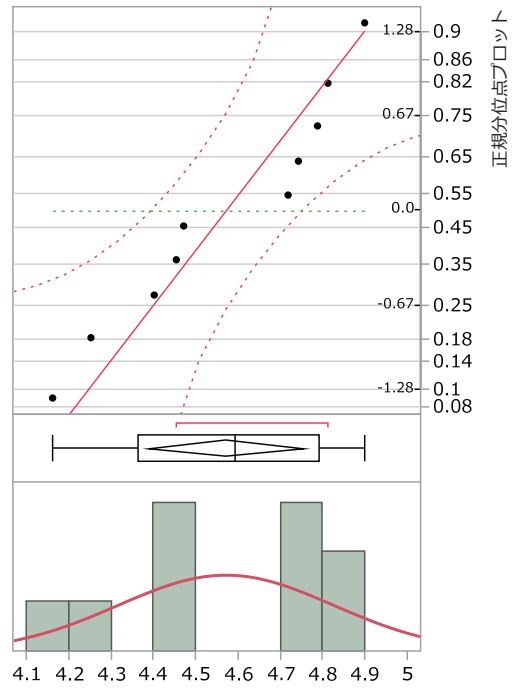


図7 標準DNA溶液におけるヒストグラムと正規確率プロット(実測値、対数解析)

検体-1



検体-3



検体-6

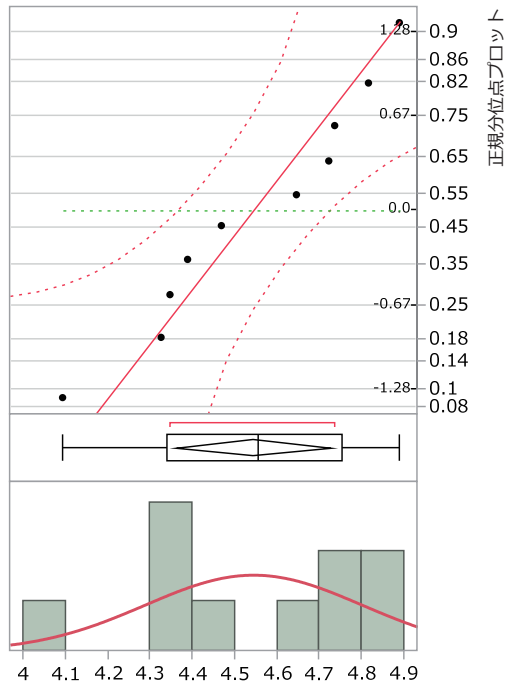
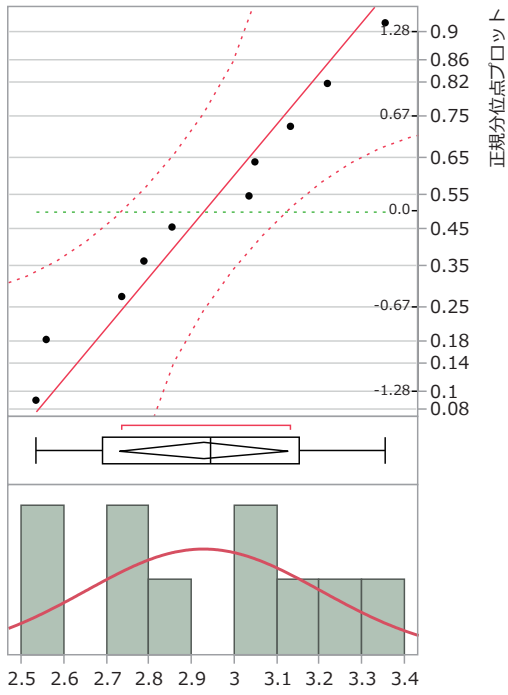
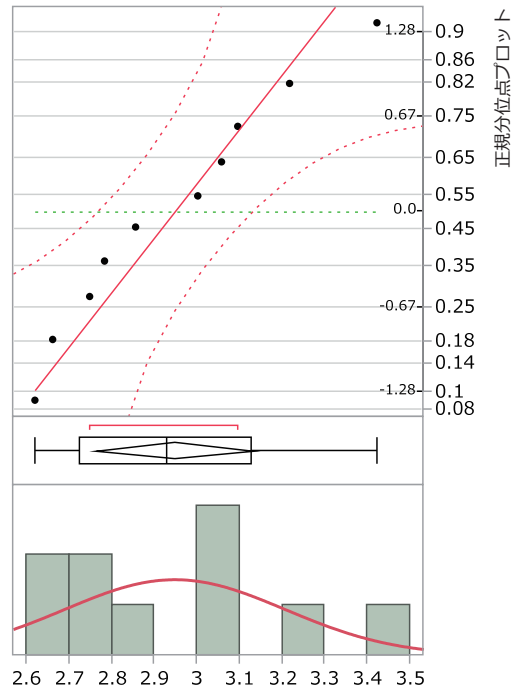


図8 高濃度検体におけるヒストグラムと正規確率プロット(実測値、対数解析)

検体-4



検体-5



検体-7

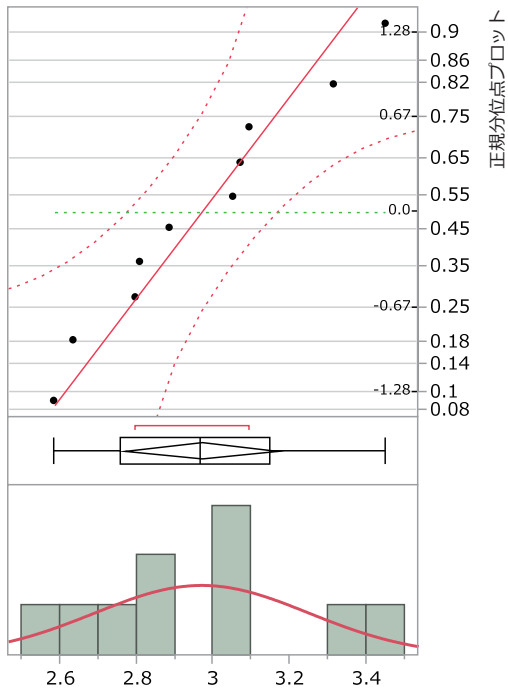


図9 低濃度検体におけるヒストグラムと正規確率プロット(実測値、実数解析)

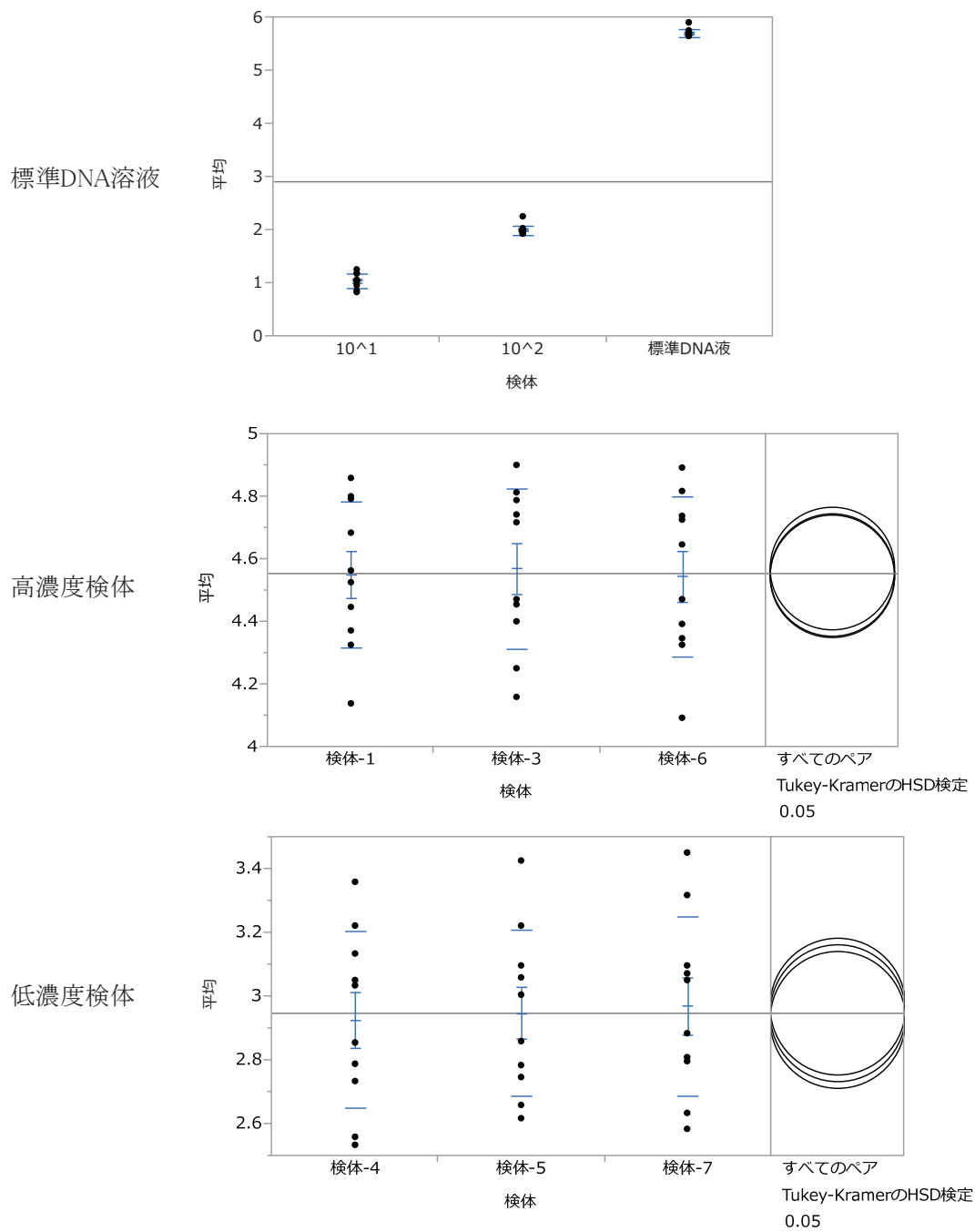


図10 調査試料における実測値(実測値、対数解析)
 高濃度検体および低濃度検体における平均値の比較はTukey-KramerのHSD検定により行った。

表5 ノロウイルス検査の外部精度管理調査結果の概要（換算値：実数解析）

検体		平均値±標準偏差	変動係数
高濃度検体	検体-1	48686275±23978857	0.492518
	検体-3	51769669±26838958	0.518430
	検体-6	49356405±26193271	0.530696
低濃度検体	検体-4	1239788.6±780334.2	0.629409
	検体-5	1286523.0±853593.6	0.663489
	検体-7	1386328.8±961358.1	0.693456

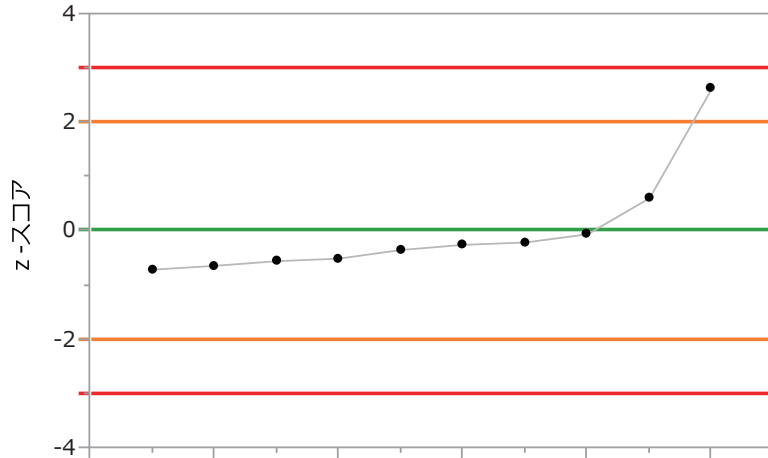
平均値、標準偏差の単位：コピー/mL

表6 ノロウイルス検査の外部精度管理調査結果の概要（換算値：対数解析）

検体		平均値±標準偏差	変動係数
高濃度検体	検体-1	7.629031±0.235246	0.030836
	検体-3	7.649203±0.255461	0.033397
	検体-6	7.623241±0.257096	0.033725
低濃度検体	検体-4	6.005359±0.277427	0.046197
	検体-5	6.026466±0.259804	0.043111
	検体-7	6.048585±0.280289	0.046340

平均値、標準偏差の単位：log（コピー）/mL

1) Z-スコア



2) Xbar-R管理図を参考とした評価

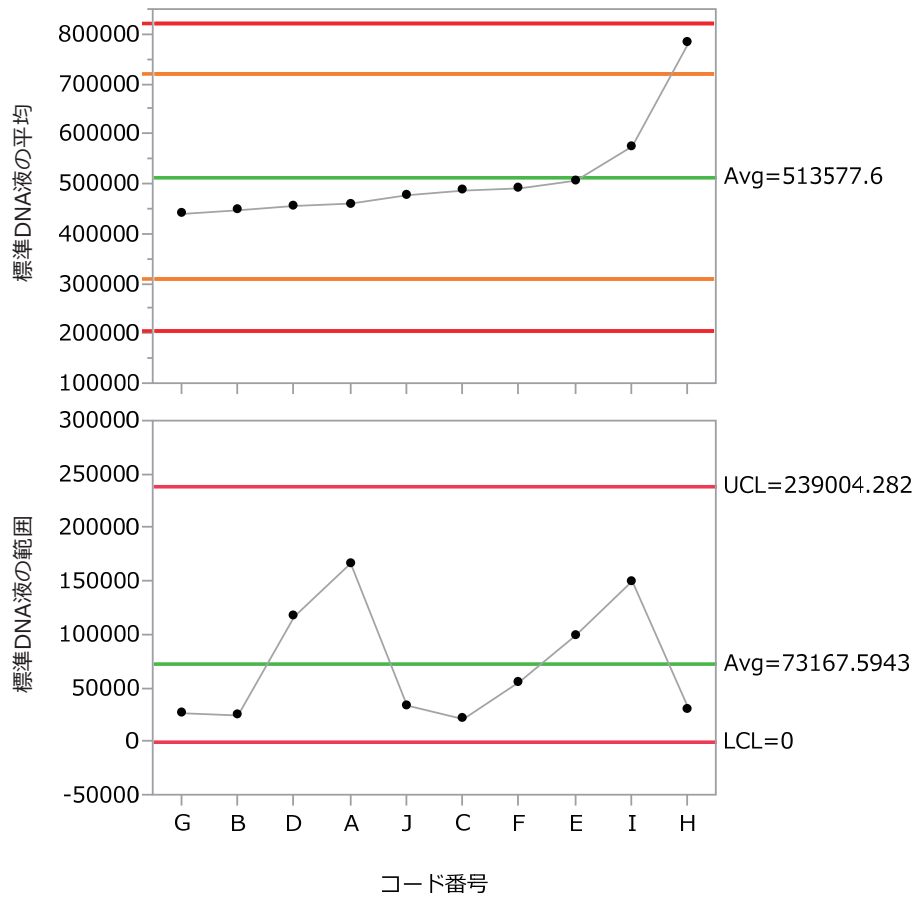
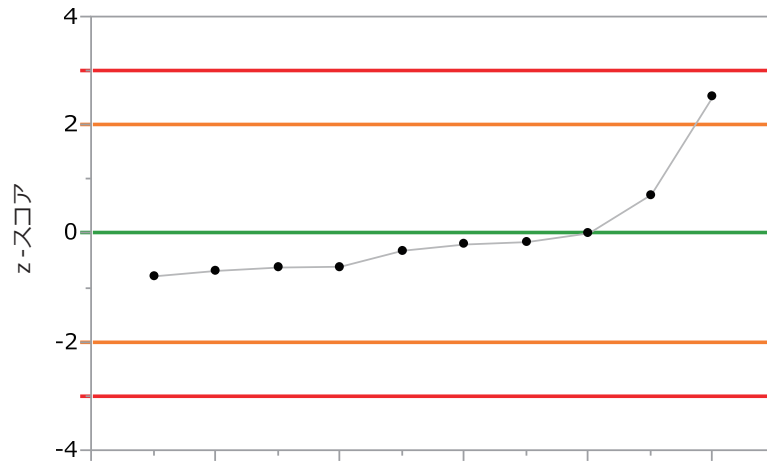


図11 標準DNA溶液(未知試料)における参加機関の評価(実測値、実数解析)
 Xbar-R管理図を参考とした評価では、管理限界線の値を|Z-スコア|=2および3とした。

1) Z-スコア



2) Xbar-R管理図を参考とした評価

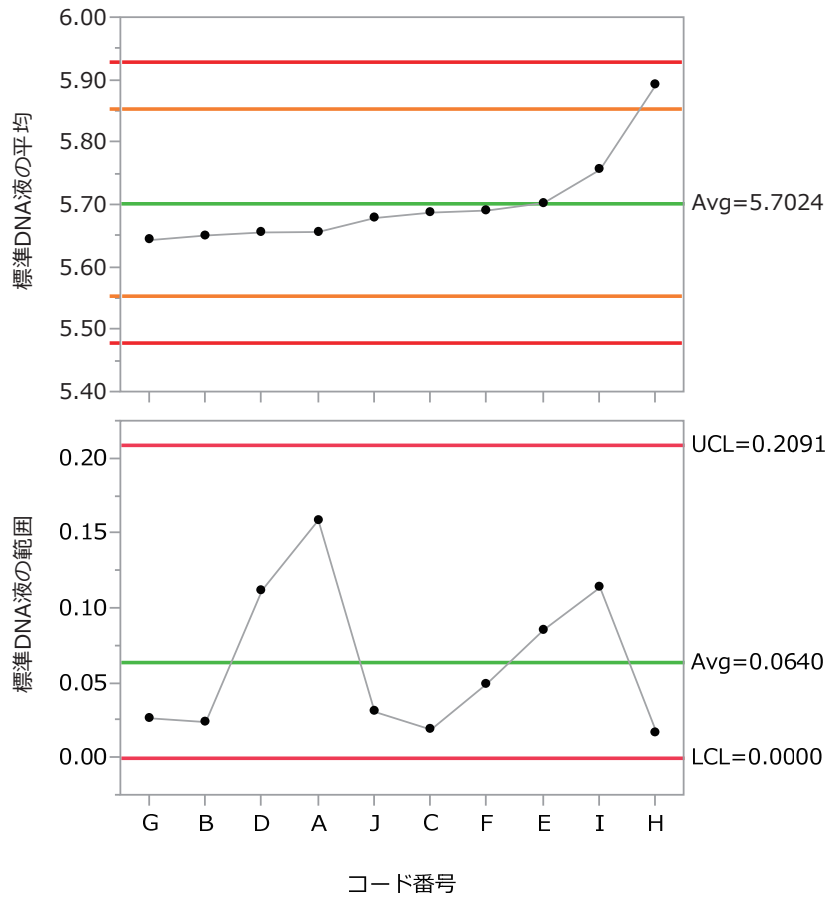
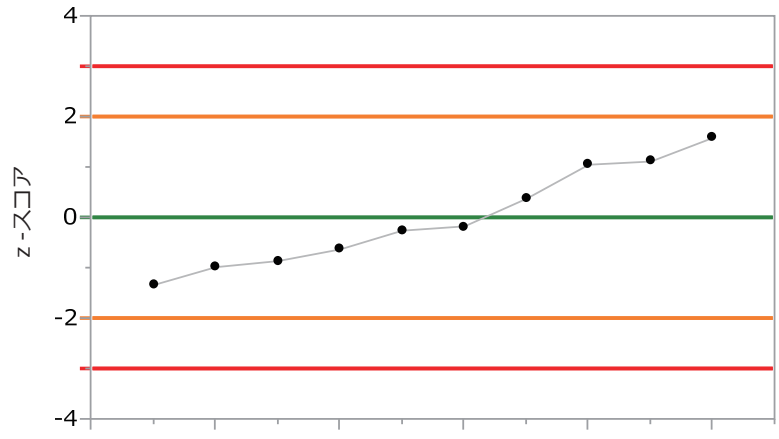


図12 標準DNA溶液(未知試料)における参加機関の評価(実測値、対数解析)
 Xbar-R管理図を参考とした評価では、管理限界線の値を|z-スコア|=2および3とした。

1) Z-スコア



2) Xbar-R管理図を参考とした評価

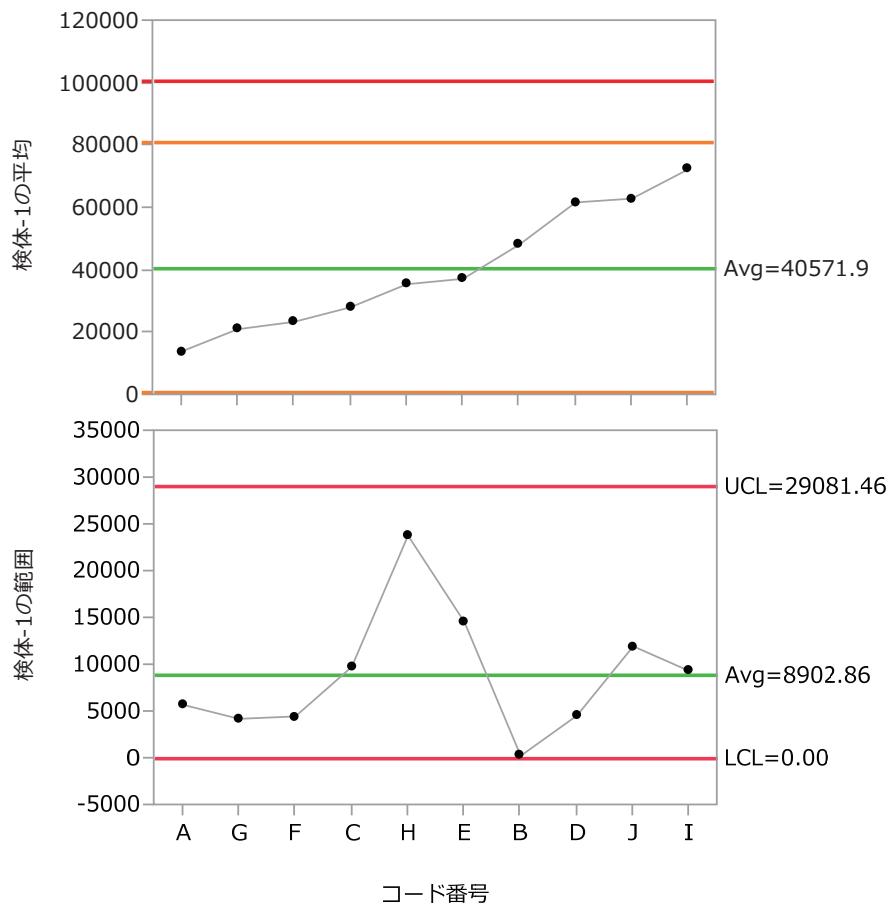
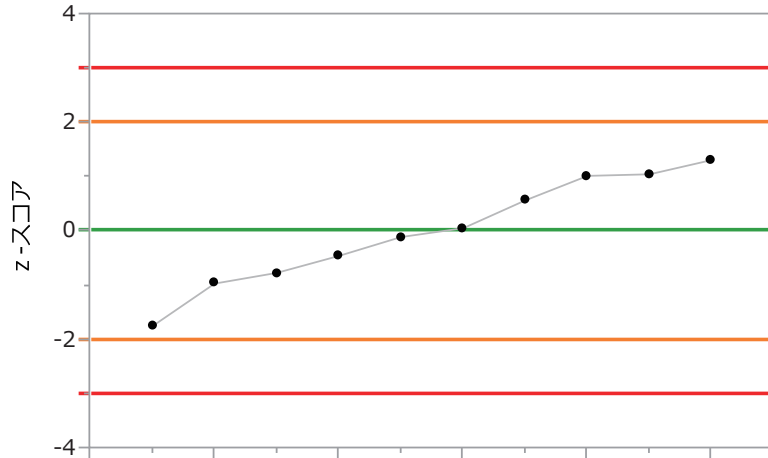


図13 検体-1における参加機関の評価(実測値、実数解析)

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。

1) Z-スコア



2) Xbar-R管理図を参考とした評価

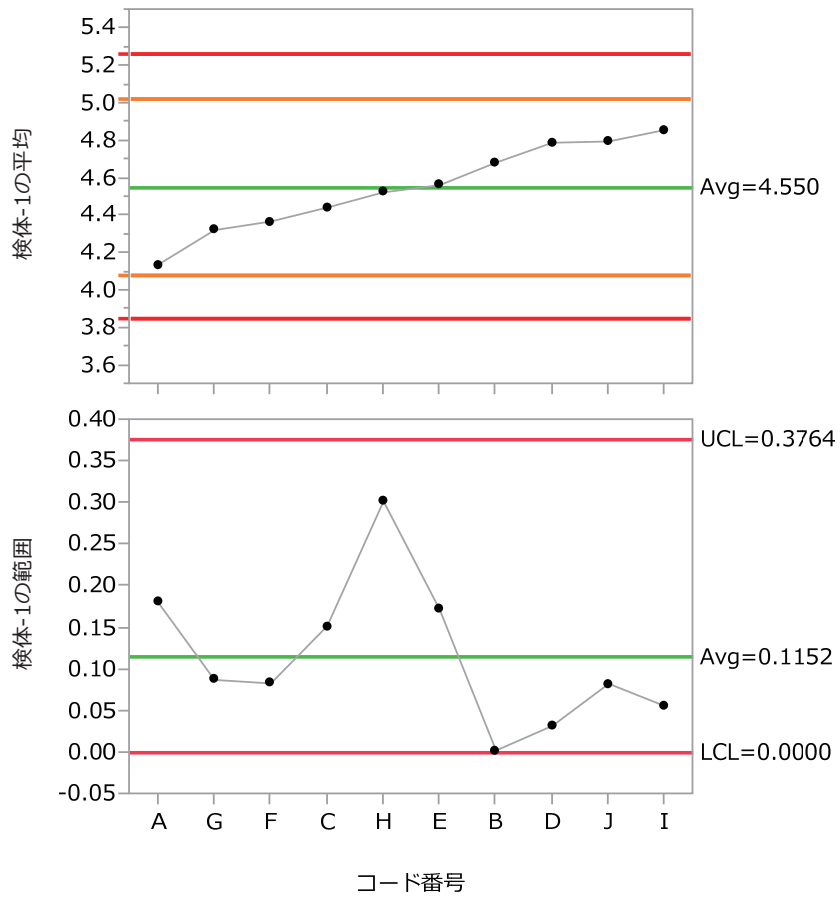
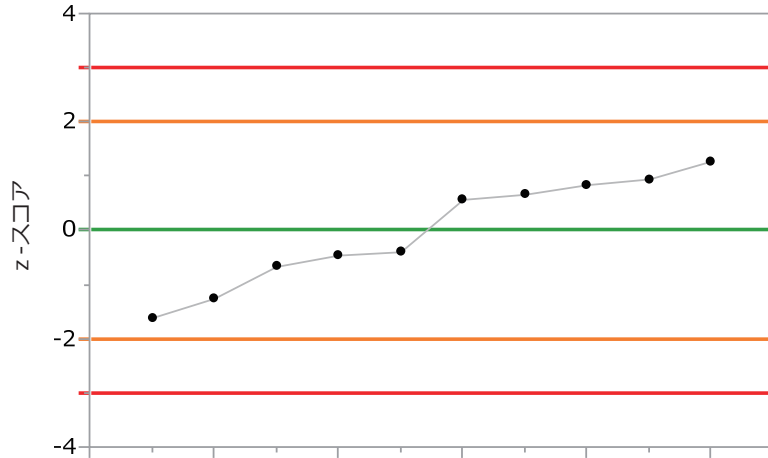


図14 検体-1における参加機関の評価(実測値、対数解析)
 Xbar-R管理図を参考とした評価では、管理限界線の値を|z-スコア|=2および3とした。

1) Z-スコア



2) Xbar-R管理図を参考とした評価

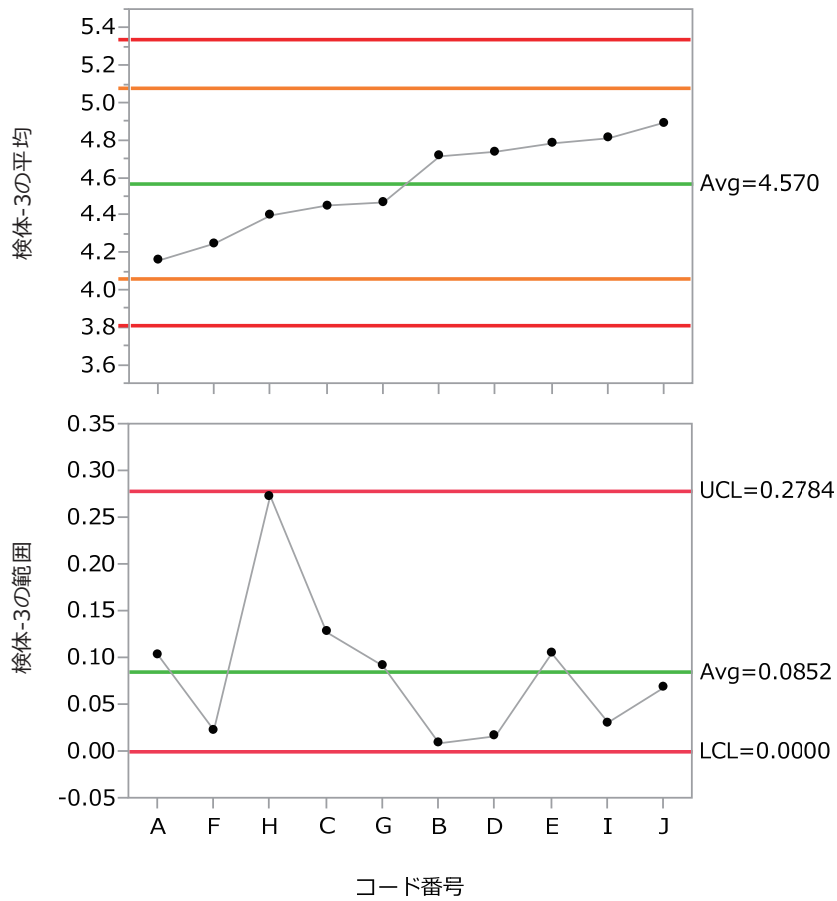
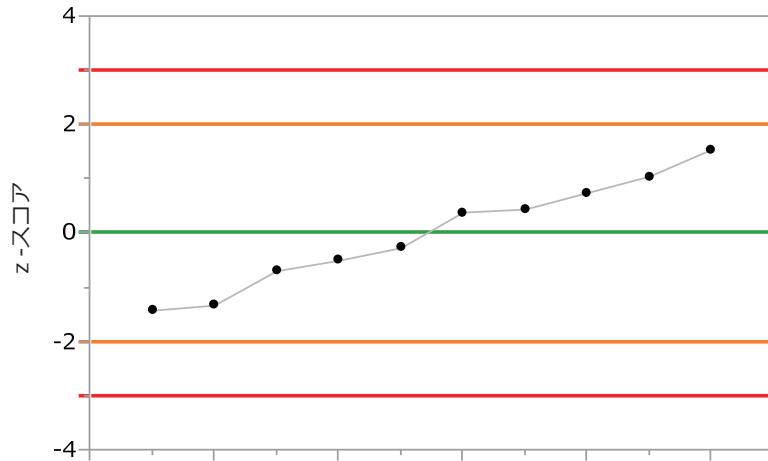


図15 検体-3における参加機関の評価(実測値、対数解析)

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。

1) Z-スコア



2) Xbar-R管理図を参考とした評価

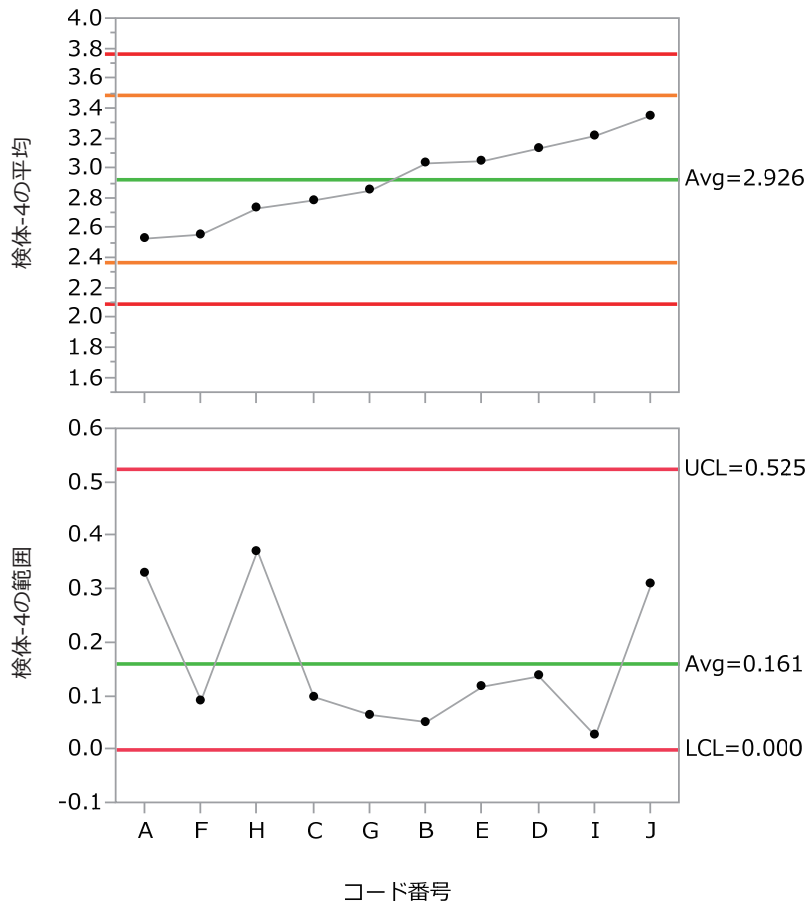
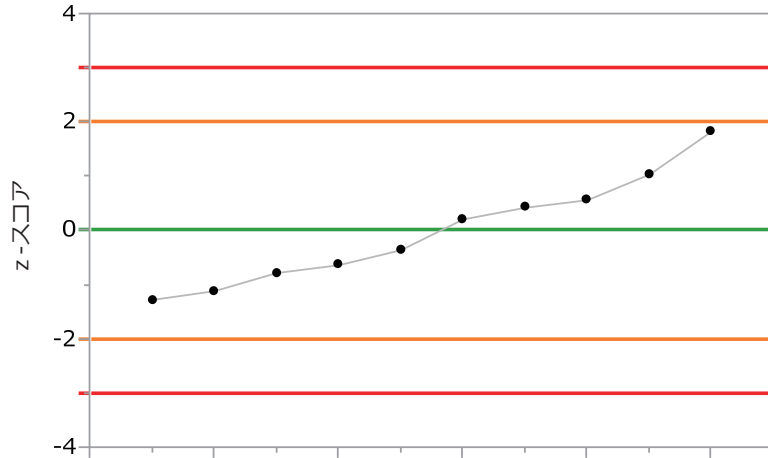


図16 検体-4における参加機関の評価(実測値、対数解析)

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。

1) Z-スコア



2) Xbar-R管理図を参考とした評価

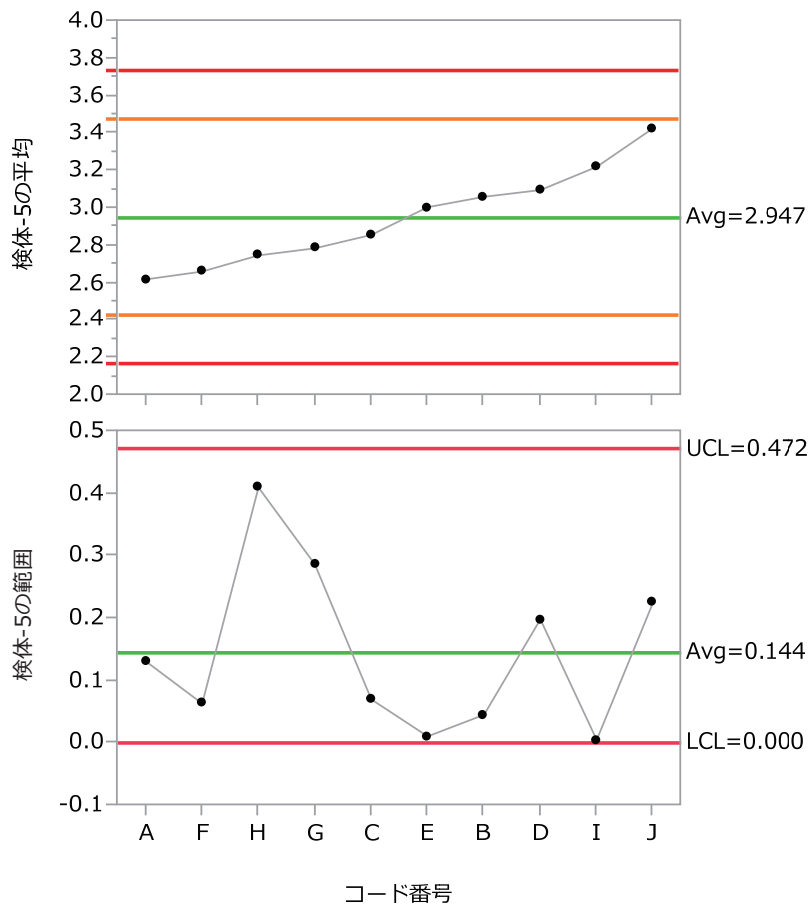
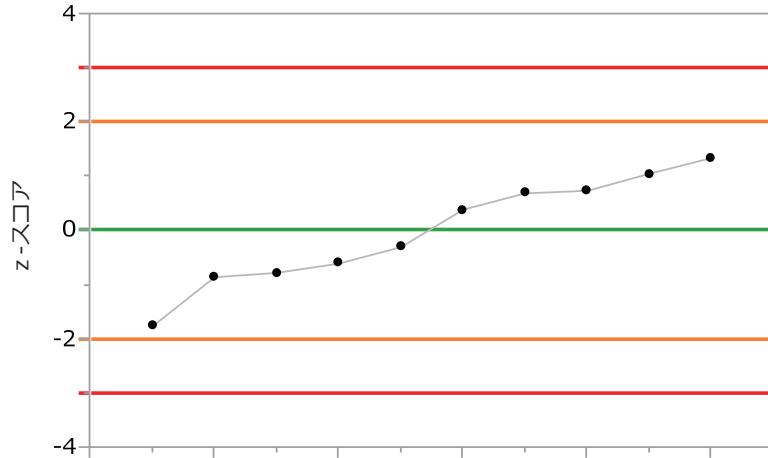


図17 検体-5における参加機関の評価(実測値、対数解析)
 Xbar-R管理図を参考とした評価では、管理限界線の値を|z-スコア|=2および3とした。

1) Z-スコア



2) Xbar-R管理図を参考とした評価

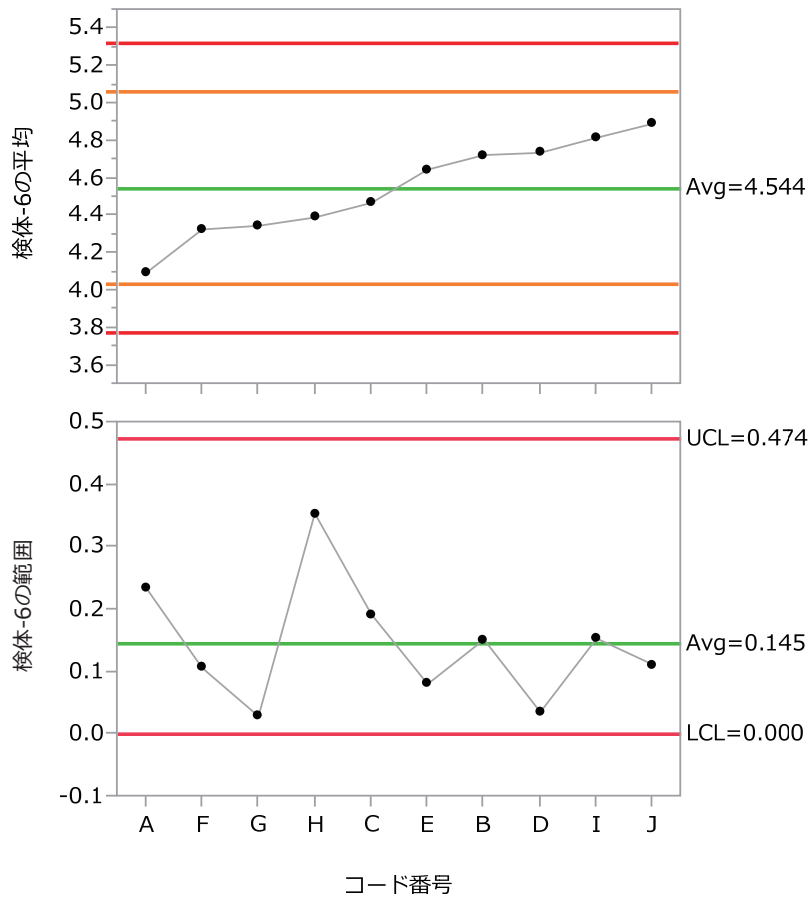
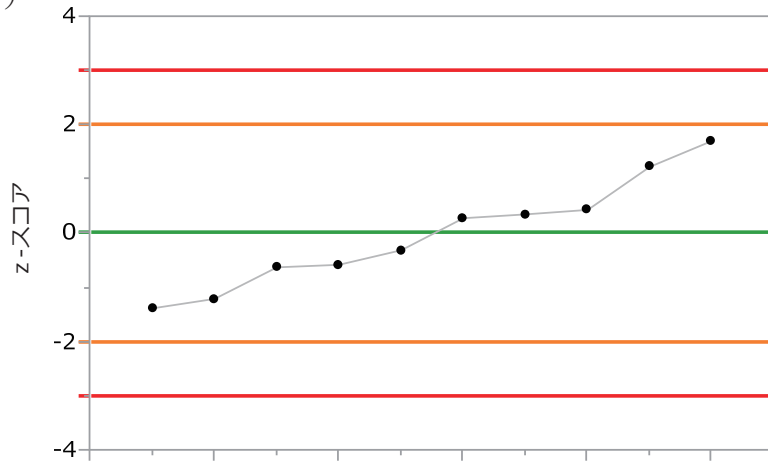


図18 検体-6における参加機関の評価(実測値、対数解析)
 Xbar-R管理図を参考とした評価では、管理限界線の値を|z-スコア|=2および3とした。

1) Z-スコア



2) Xbar-R管理図を参考とした評価

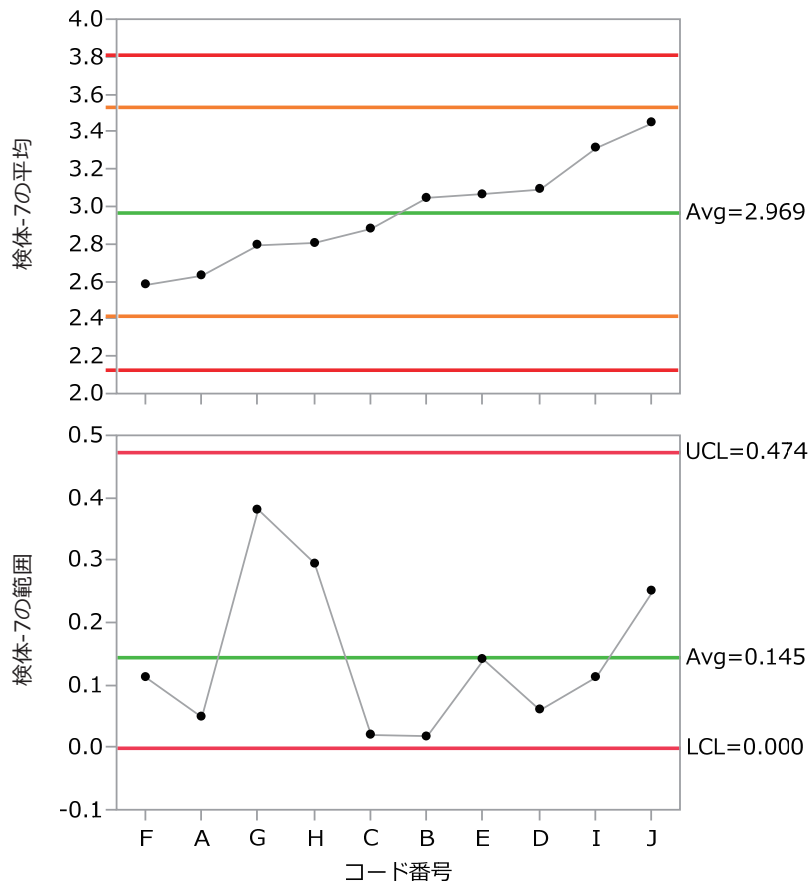
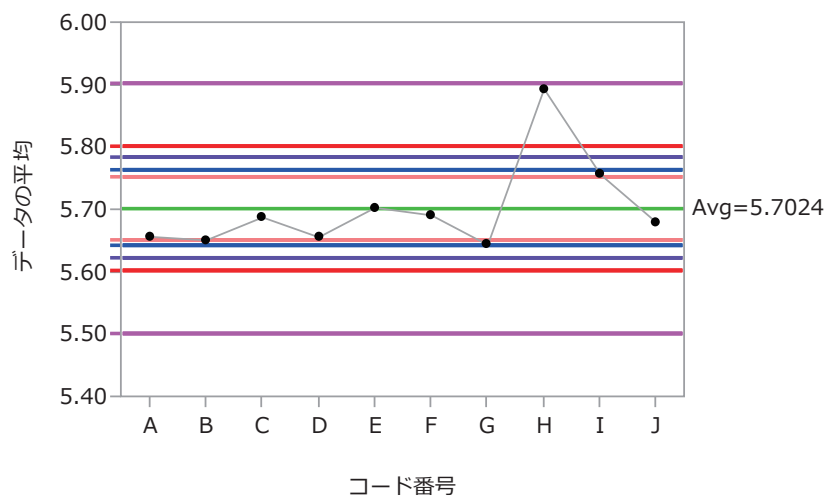


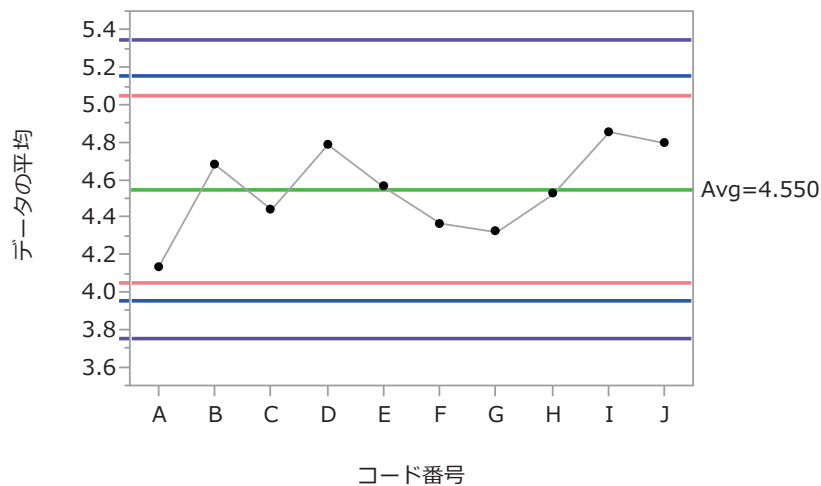
図19 検体-7における参加機関の評価(実測値、対数解析)

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。

1) 標準DNA溶液



2) 検体-1



3) 検体-3

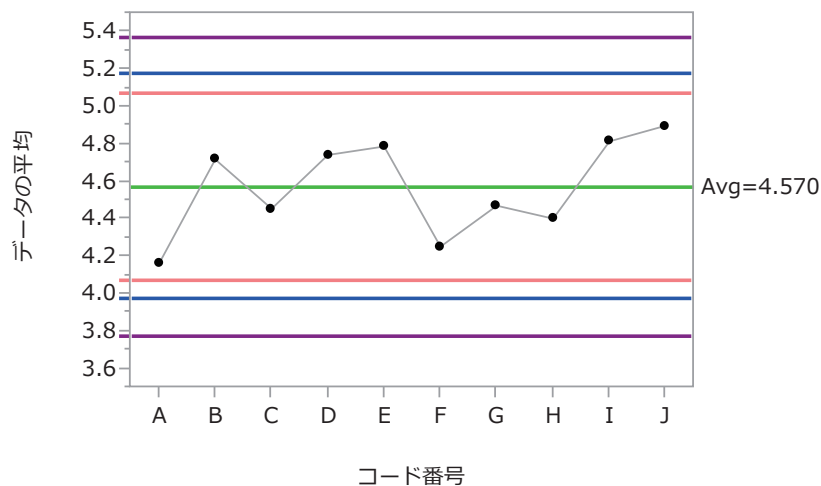
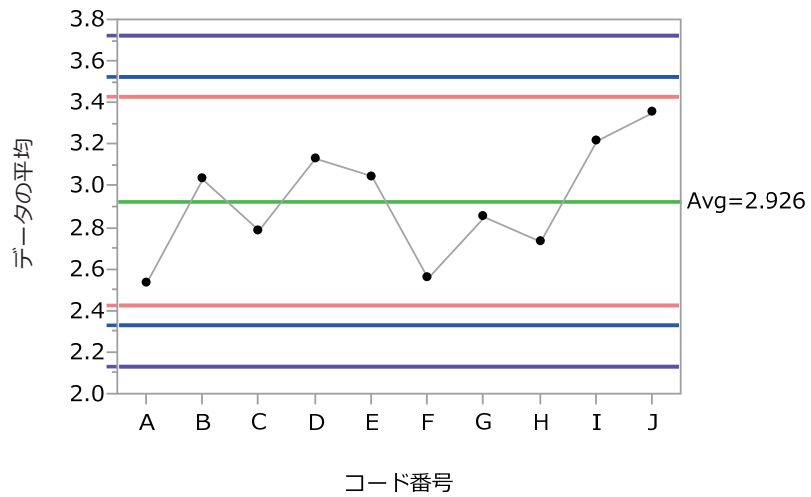
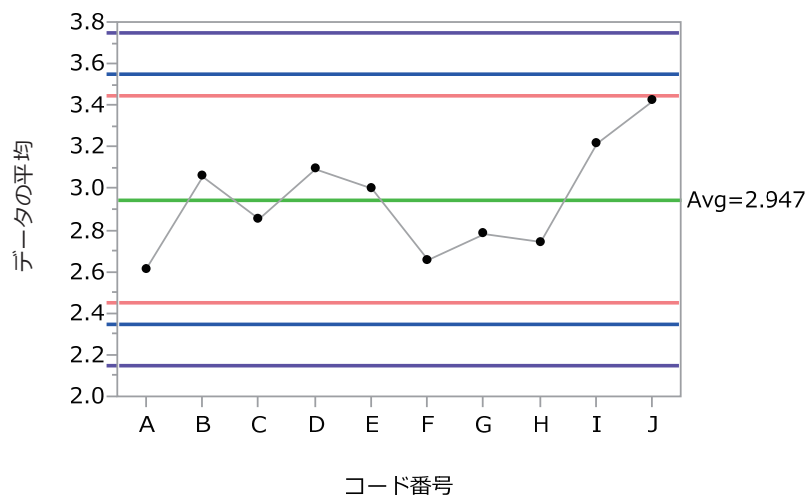


図20 調査試料における一定の標準偏差を用いた参加機関の評価(実測値、対数解析)
 1)標準偏差を0.025、0.03、0.04、0.05および0.1としたときの2倍の値を管理限界線とした。
 2)、3)標準偏差を0.25、0.3および0.4としたときの2倍の値を管理限界線とした。

1) 検体-4



2) 検体-5



3) 検体-6

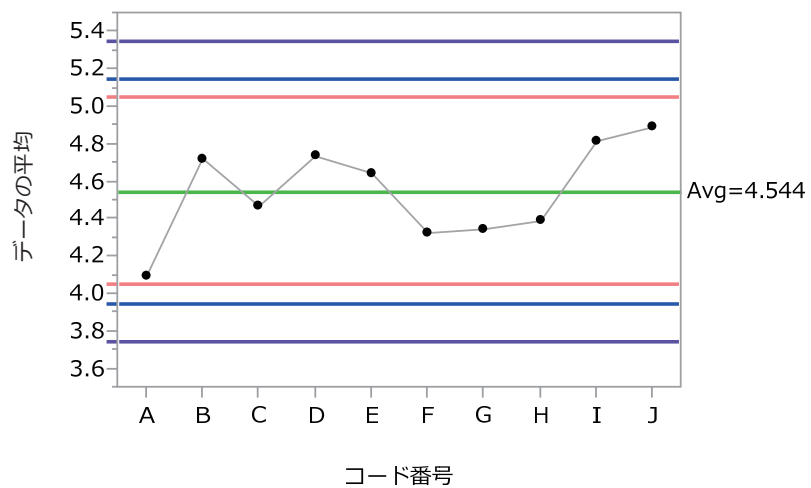


図21 調査試料における一定の標準偏差を用いた参加機関の評価(実測値、対数解析)
標準偏差を0.25、0.3および0.4としたときの2倍の値を管理限界線とした。

1) 検体-7

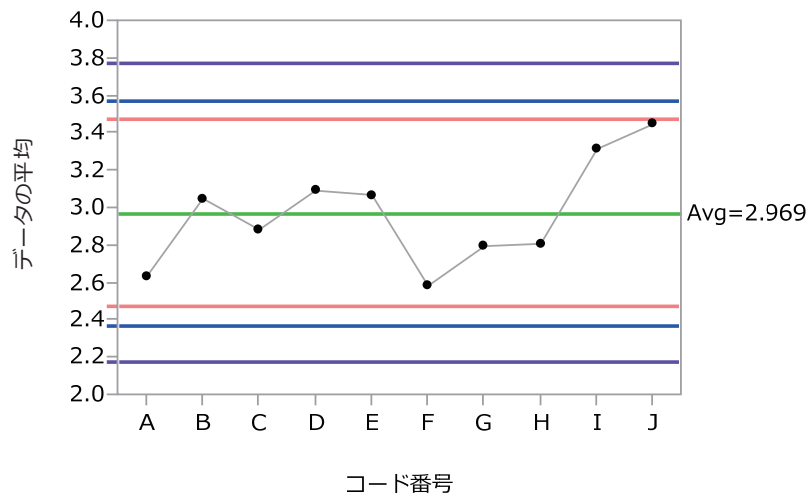


図22 調査試料における一定の標準偏差を用いた参加機関の評価(実測値、対数解析) 標準偏差を0.25、0.3および0.4としたときの2倍の値を管理限界線とした。

平成 28 年度厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)
「ウイルスを原因とする食品媒介性疾患の制御に関する研究」
研究分担報告書

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

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

パンソルビン・トラップ法は、食品検体に含まれるウイルス粒子を黄色ブドウ球菌(ブ菌)の表面に吸着させて回収することを基本原理としている。その際に、ウイルスをブ菌に吸着させる”糊”の役目を果たす捕捉抗体としてガンマグロブリンが用いられている。一方、ガンマグロブリンは過去に流行したウイルスに対する抗体の集積であり、ノロウイルス GII.17 のような、これまで流行したことのない型に対する抗体は含まれていないことが危惧された。本研究では、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。添加回収試験において、GII.17 の回収率は GII.4 のそれには及ばないものの、汚染濃度が低くなるにつれて高くなる傾向が認められた。さらに、低濃度領域の汚染を検出するために用いられる nested real-time PCR を用いた検討では、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。この成績は、すでに発表済の GII.4 におけるものと同様であった。実際の食中毒事例は微量の汚染に起因していることから、ガンマグロブリンを捕捉抗体として用いるパンソルビン・トラップ法は、GII.17 に対しても問題なく適用できることが示された。

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(SaV)やアデノウイルス 41 型(AdV41)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

では輸入食品等が原因と考えられる A 型肝炎ウイルス(HAV)や、野生動物に由来する E 型肝炎ウイルス(HEV)の感染報告が急増するなど、食品中のウイルスを検出する方法の確立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、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 と標記)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する必要があったため、今年度の研究としてこれを実施した。

B. 研究方法

1. 研究材料

ガンマグロブリンの検討に用いる食品として、市販されているポテトサラダと焼きそばを用いた。また、検出対象となるウイルスとして、NoV GII.17 (2016 年 1 月 28 日、感染症発生動向調査にて採取)、及び GII.2(2016 年

12 月 26 日、集団感染事例における積極的疫学調査で採取)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。

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

黄色ブドウ球菌(ブ菌)を熱処理してホルマリン固定したものの懸濁液で、メルク社から購入した。

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

回収率の検討には COG2R (J. Clin. Microbiol., **41**, 1548-1557, 2003)を、検出限界の検討には PANR-G2 (Food Environ. Virol., **7**, 239-248, 2015)用いた。

13) conventional PCR に用いたプライマー

1st. PCR では COG2F / G2SKR (J. Virol. Methods, **100**, 107-114, 2002)、2nd.PCR では G2SKF / G2SKR のプライマーセットをそれぞれ用いた。

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」を用いた。

16) real-time PCR 用酵素

日本ジェネティクス社製「FastStart Essential DNA Probes Master」を用いた。

17) real-time PCR 反応系

Kageyama らの方法 (J. Clin. Microbiol., **41**, 1548-1557, 2003) に従った。

18) 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。

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。

4. NoV GII.17 の回収率に関する検討

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ソルビン・トラップ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。ここでは純粋に抗原抗体反応を比較する必要から、逆転写反応には COG2R を用いた。このプライマーは、次に続く real-time PCR 反応の直前に位置するため、RNA の損傷度や逆転写反応効率等のファクターを排除することができるからである。

5. NoV GII.17 の検出限界に関する検討

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、または RT-PCR による 2nd. PCR により検出できる限界について検討した。ここでの逆転写反応は PANR-G2 を用いた。サーマルサイクラーの設定条件は、次のとおりである。

【タッチダウン PCR】

95°C 2 分 1 サイクル

95°C 30 秒 - (55→50°C) 30 秒 - 72°C 30 秒
5 サイクル: 下線部がタッチダウン設定

95°C 30 秒 - 50°C 30 秒 - 72°C 30 秒 40 サイクル

72°C 7 分 1 サイクル

C. 研究結果

1. NoV 感染時の免疫応答

図 3 に示すとおり、NoV GII.17 に感染した場合、特に初感染時において GII.3 や GII.4 といった、他の遺伝子型の IgG も上昇していることが見て取れる。逆に GII.4 に感染した場合においても、GII.3 と GII.17 の IgG の上昇が認められた(図 4A、4B)。

2. NoV GII.17 の回収率に関する検討

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)。

3. NoV GII.17 の検出限界に関する検討

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。同様に RT-PCR 後のゲル電気泳動でも、35 コピー/g までの検出でき、PCR 産物をシークエンスしたところ正しく NoV GII.17 の配列であった(図 6)。

D. 考察

1. NoV 感染時の免疫応答について

現在パンソルビン・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、様々な遺伝子型の NoV に対する抗体の推移について検討した。NoV GII.17 に感染した場合、そのウイルスに対する抗体は当然のごとく上昇するが、図 3 によると、GII.3 や GII.4 に対する抗体も同時に上昇していることがわかる。次に逆のケースとして、NoV GII.4 に感染した際の免疫応答について検討した。図 4A、4B 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。

2. NoV GII.17 の回収率について

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、パンソルビン・トラップ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 3 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。

3. NoV GII.17 の検出限界について

表1の検討において、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。また、検出ウイルスの遺伝子配列を調べるために、**real-time PCR** に替えて **conventional PCR** を用いた場合でも 35 コピー/g まで検出可能で、この増幅産物は今後のシーケンス解析用いることができた(図6)。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。

4. 補遺

今シーズンに保育園等での大規模な流行

が見られた NoV GII.2 に関して、一部報道機関において”変異型 GII.2”との標記が用いられたが、図7に示したとおり、ガンマグロブリンを捕捉抗体としたパンソルビン・トラップ法で問題なく回収できることを確認している。

5. まとめと今後の課題

昨年度までの「食品中の病原ウイルスの検出法に関する研究(H25-食品-一般-012)」で残された課題の一つとして、新たな型に対する捕捉抗体の見直しが挙げられたが、本研究においてガンマグロブリンの有用性が再評価された。これまで流行したことの無い型に対する抗体はガンマグロブリンに含まれていないことが危惧されたが、実際に NoV に対する免疫応答を検討すると、感染した型とは別の型に対する抗体も同時に誘導されてくることがわかった。特に 2012 年に GII.4 に感染したケースでは、2 年後の 2014 年以降に流行する GII.17 に対する抗体も誘導されていた。このことから、新しい型に対する抗体といえども、ガンマグロブリンに含まれていることが期待できるようになり、添加回収試験等を行ったところそのことが証明された。将来的に、“新型”と称されるウイルスが流行したとしても、第一選択としてガンマグロブリンは有用であると考えられる。その際の検証方法としては、回収率の評価だけではなく、**nested real-time PCR** による検出限界も合わせて検討する必要がある。

他の食中毒起因ウイルスとしては、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る必要があるが、捕捉抗体の供給源を確保することが重要である。

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ふ。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。加えて、今後はウイルスの回収効率を客観的に評価する必要性も生じてくることから、内部標準物質の使用についても検討を進める必要がある。

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。

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) Hiroyuki Saito, 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)

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
- 5) 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
- 6) 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
- 7) 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
- 8) 斎藤博之、秋野和華子、佐藤寛子、清水優子、早川智、牛島廣治: 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

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

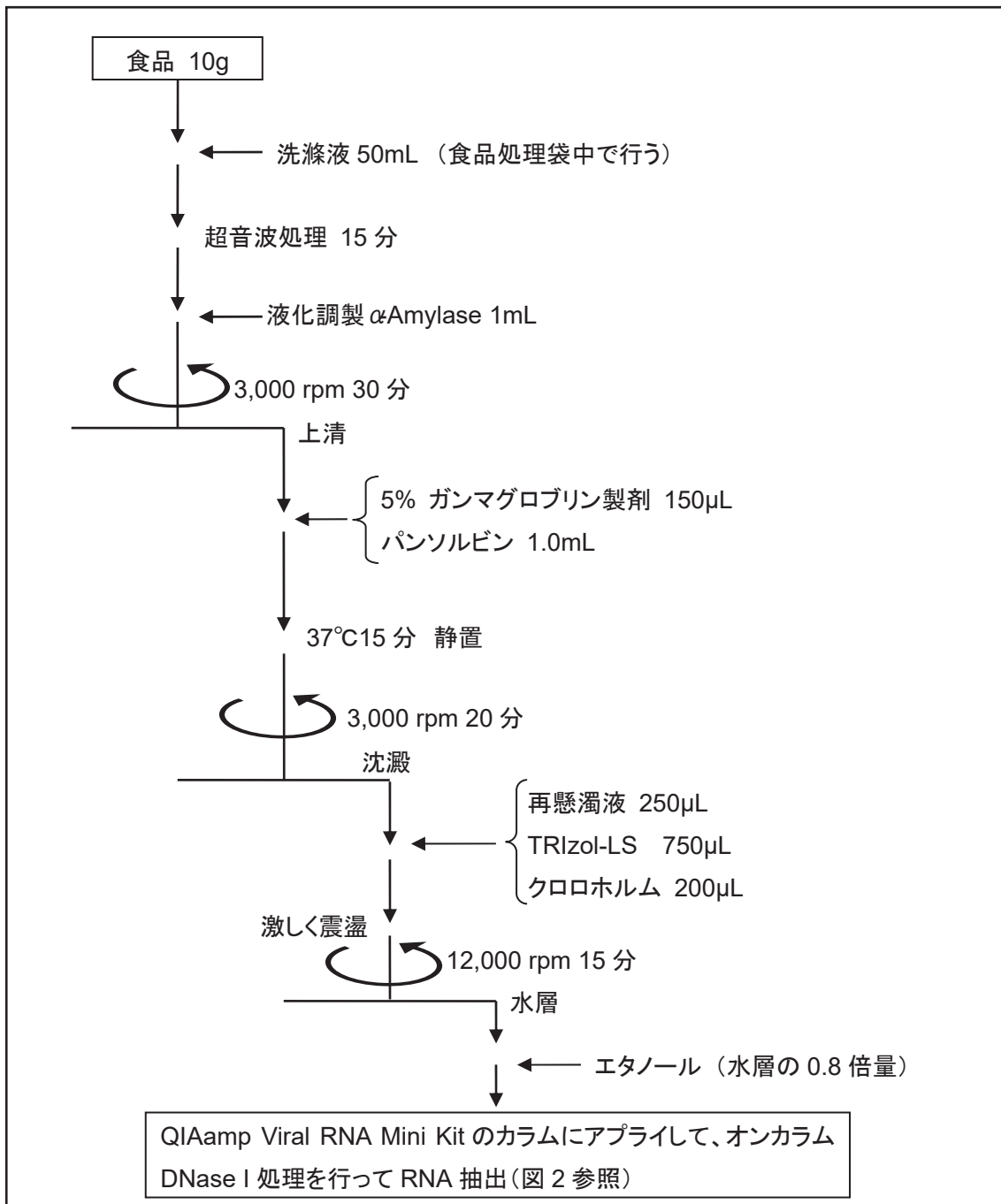


図 1 パンソルビン・トラップ法の操作手順

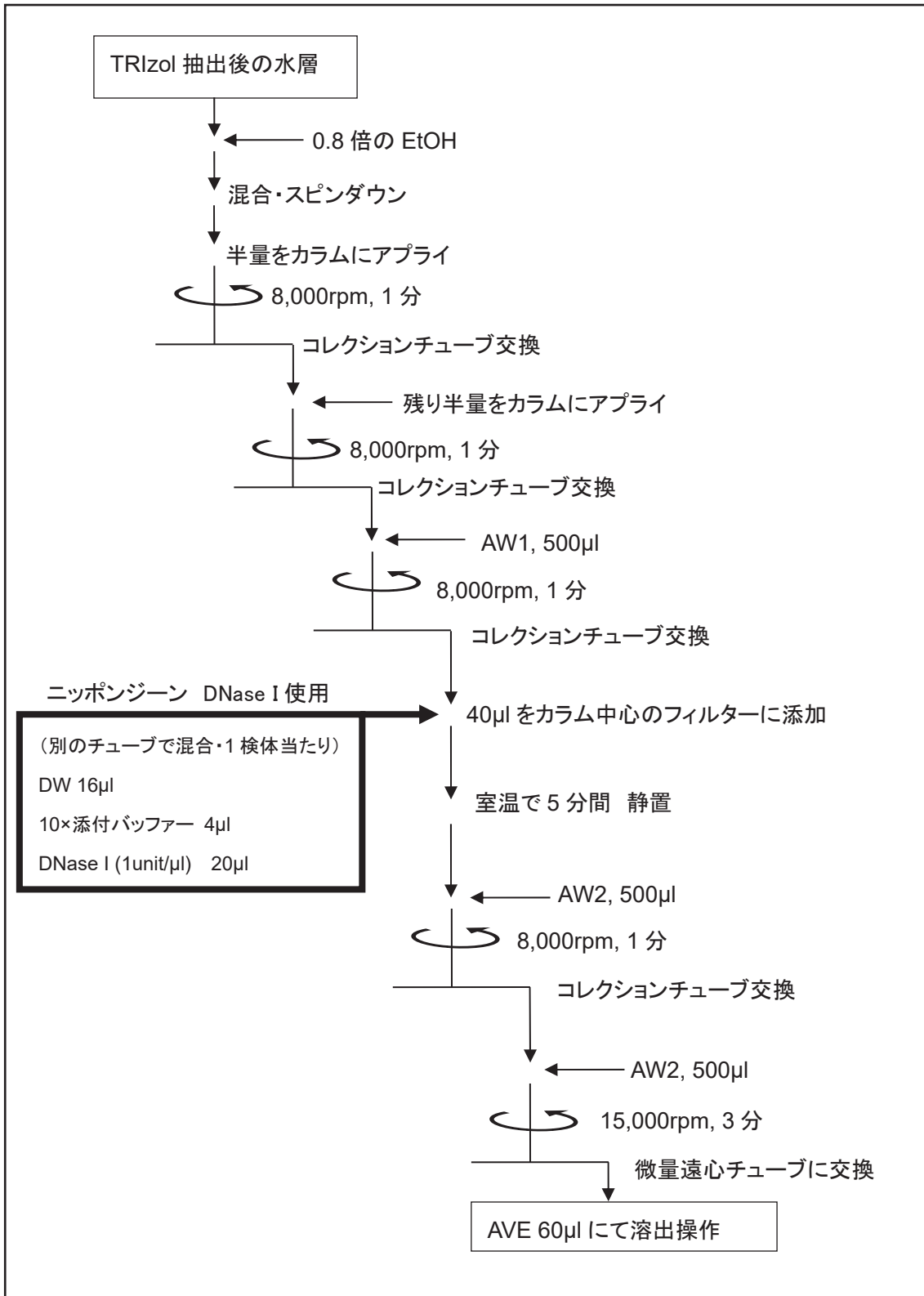


図2 QIAamp Viral RNA Mini Kit へのオンカラム DNase I 処理

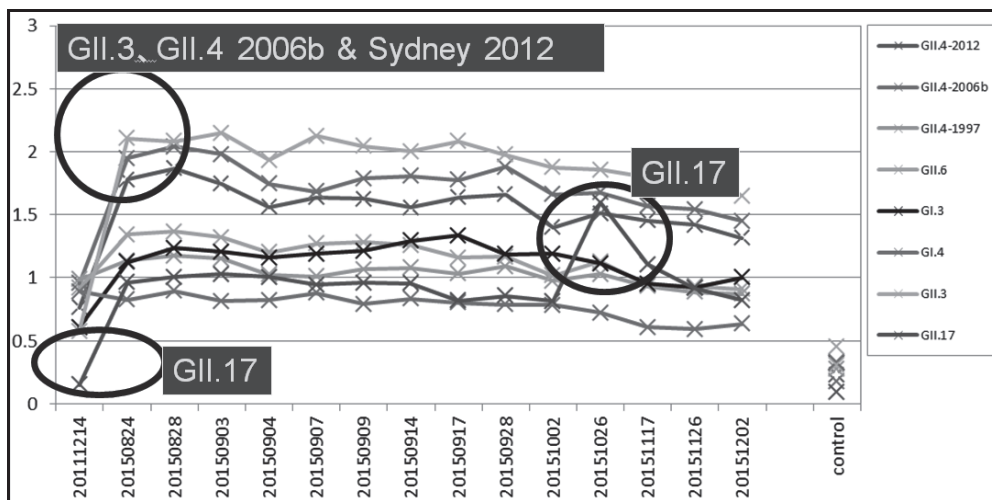


図3 NoV GII.17 感染時の血清 IgG の推移

感染日： 2015 年 8 月 5 日 (初感染), 10 月 12 日 (再感染)

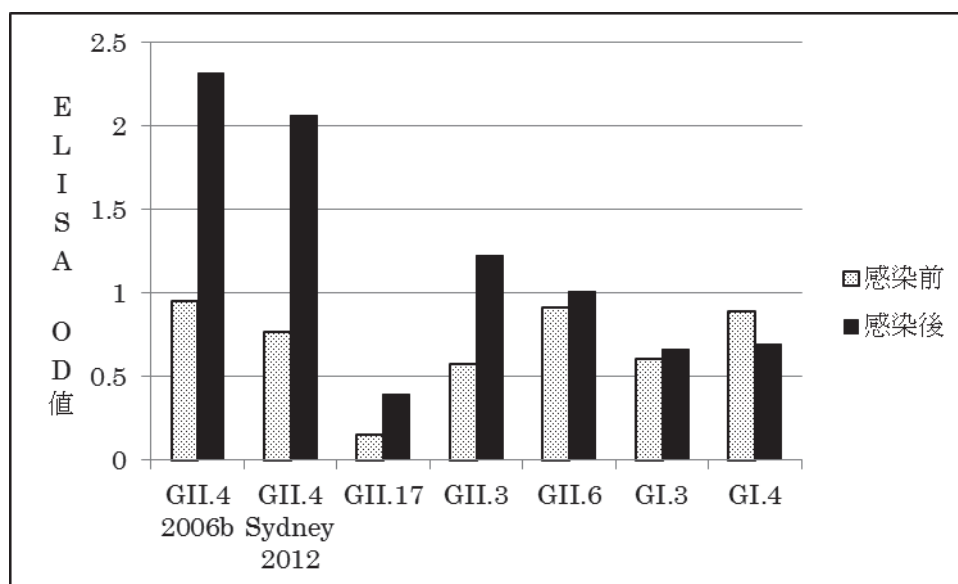


図4A NoV GII.4 感染時における血清 IgG の応答 (ELISA OD 値)

感染日： 2012 年 12 月 4 日

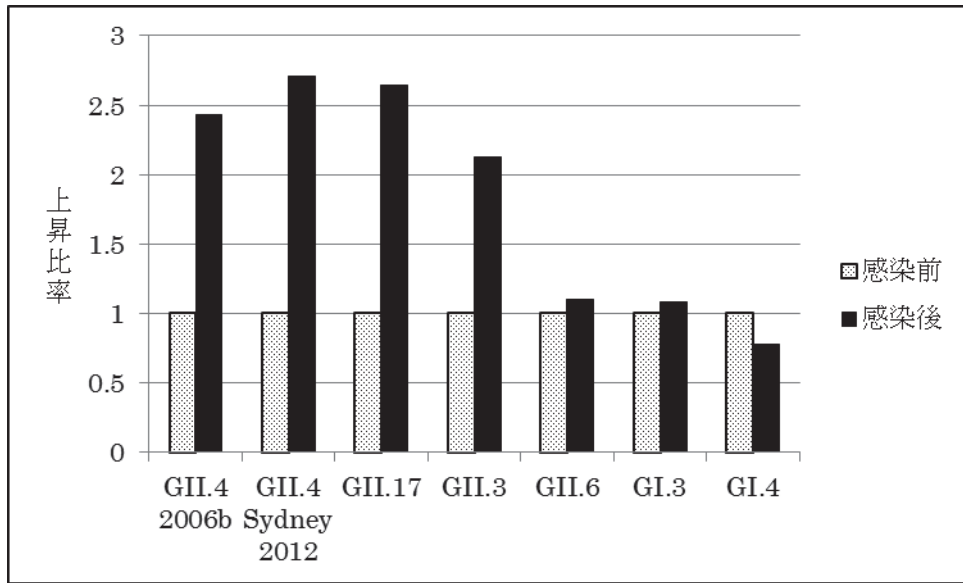


図 4B NoV GII.4 感染時における血清 IgG の応答(上昇比率)

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

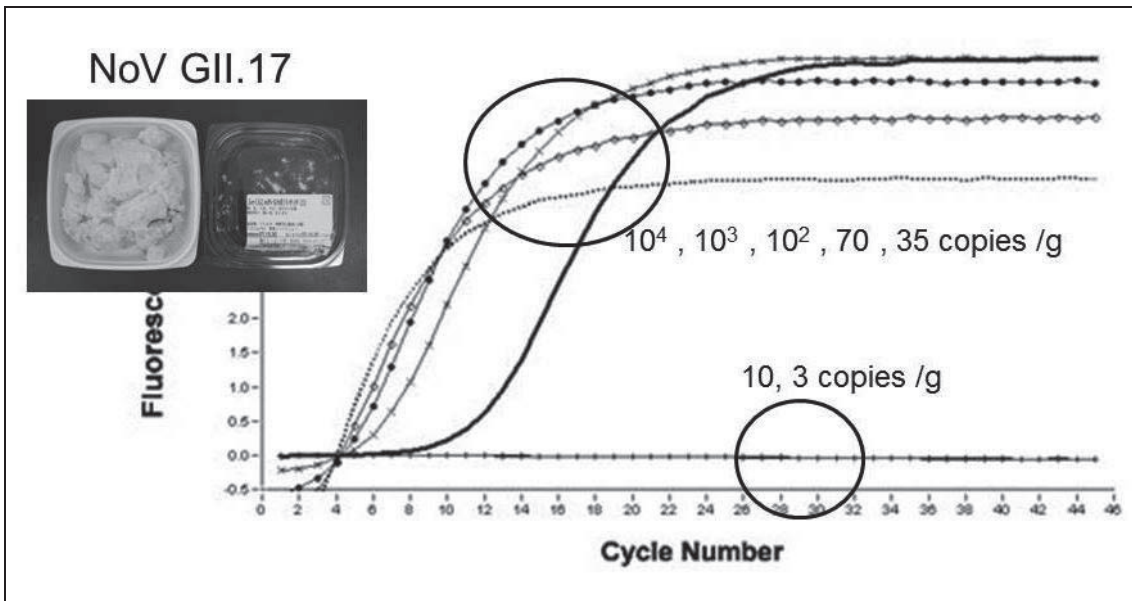


図 5A Nested real-time PCR による検出限界 (ポテトサラダ)

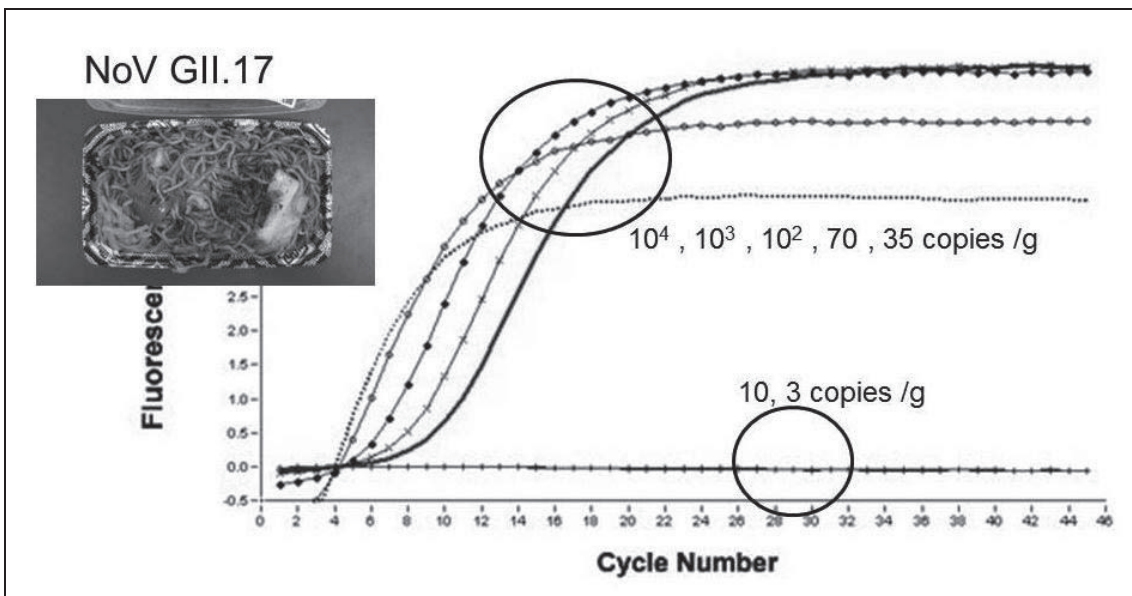


図 5B Nested real-time PCR による検出限界 (焼きそば)

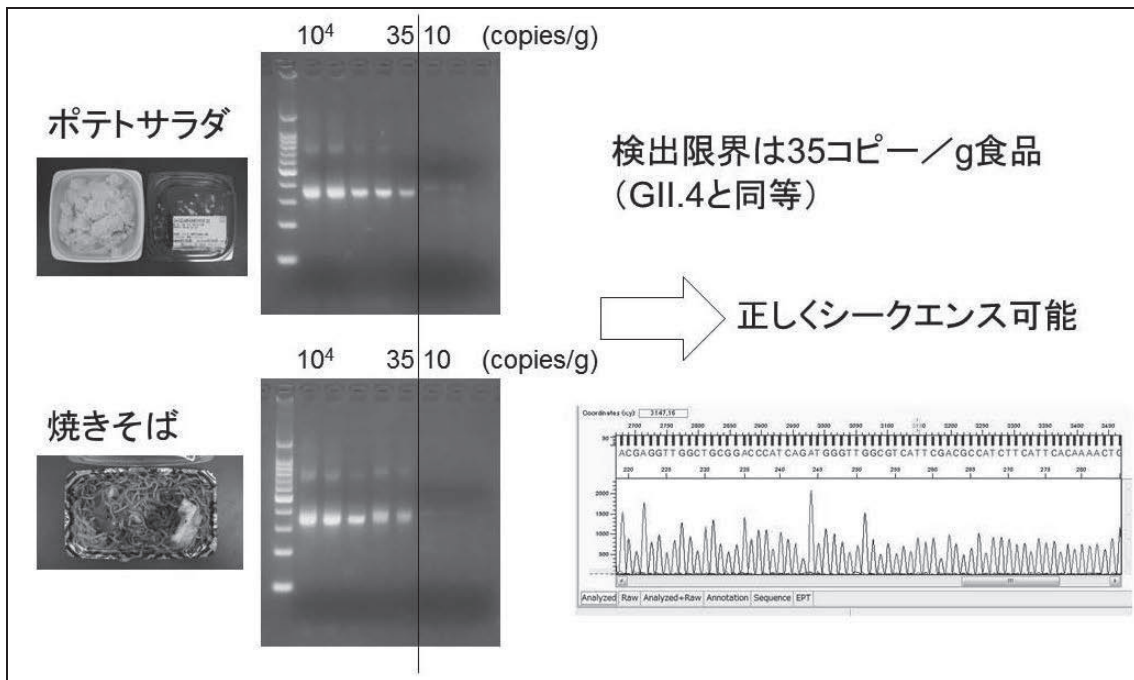


図6 Nested RT-PCRによる検出限界

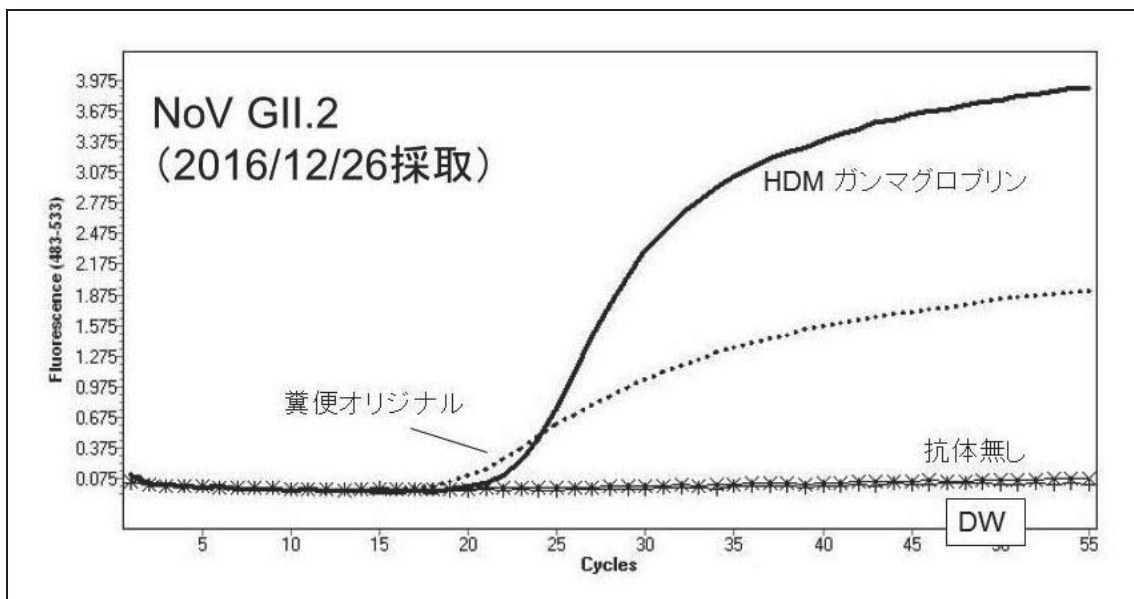


図7 食品洗滌液 50mLからの NoV GII.2(2016/2017シーズン)の回収率

添加量: 3.94×10^5 コピー

回収量: 1.48×10^5 コピー

回収率: 37.5 %

平成 28 年度厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)
「ウイルスを原因とする食品媒介性疾患の制御に関する研究」
研究分担報告

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シング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シング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シング法 (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、散発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、小淵正次：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

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

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

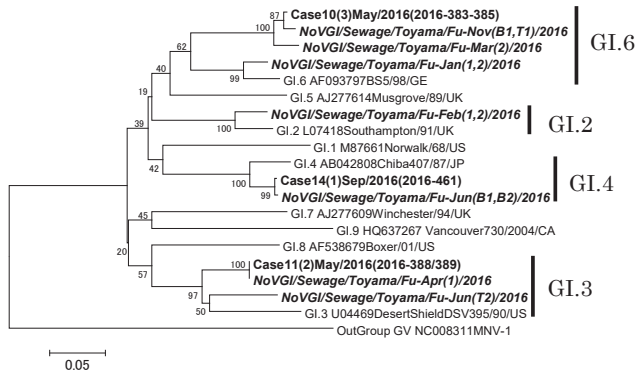
ウイルス		2016年												計
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
NoV	GII.2												2	2
	GII.3				1		1							2
	GII.4	1		1		1								3
SaV	GI.1	1					1					1	1	4
合計		2	0	1	1	1	2	0	0	0	0	1	3	11

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

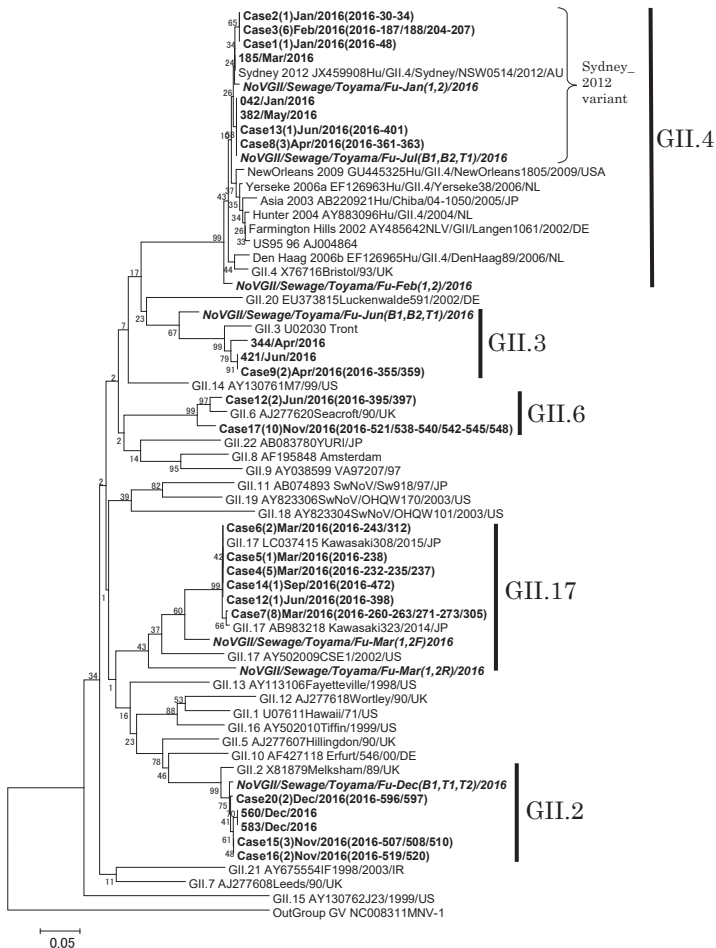
サポウイルスは非検出

図 1. ノロウイルス GI の系統樹



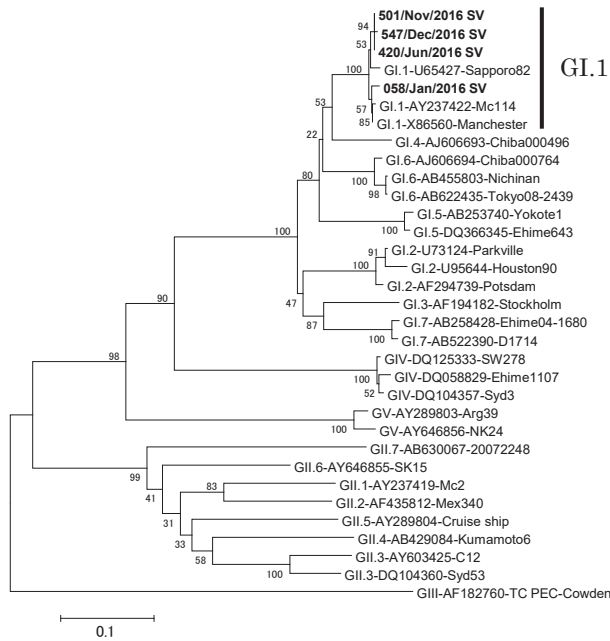
太字のうち斜体は下水流入水から、それ以外は患者から検出されたウイルスを示す。その他の場合は参考株（型別 accession no./株名）を示す。

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
Sapovirus	リード数	8	9	6	22	38	50	0	0	0	0	2
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	GII.2		4		3	4						
	GII.3		3		3	1	2					
	GII.4	18	5	4	4	4	2					2
	GII.6			2								
	GII.7					1						
	GII.12	2	2	1	4							
	GII.13		2									
	GII.14			2	3	2						
NoV GIV	GII.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

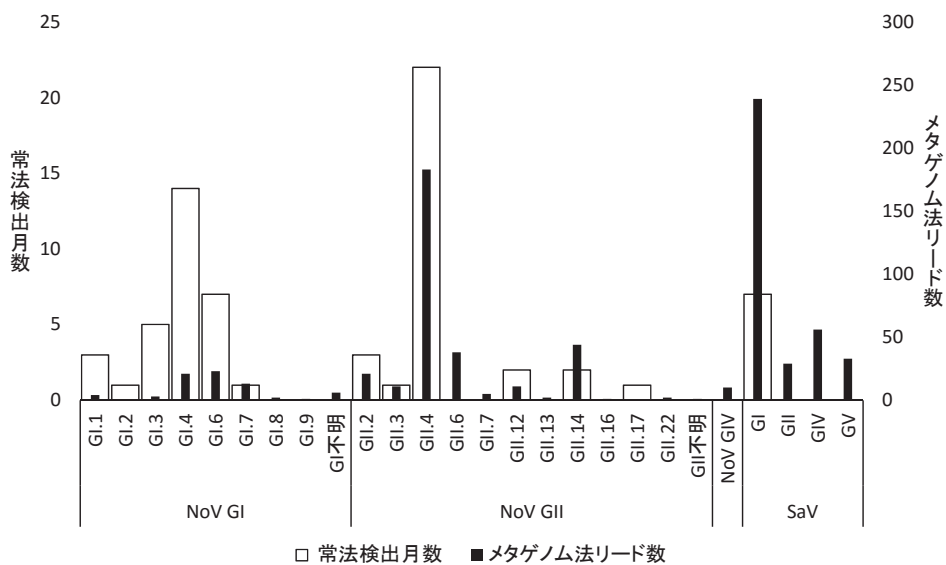
B. 2012 年

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)



平成 28 年度厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)
「ウイルスを原因とする食品媒介性疾患の制御に関する研究」
研究協力報告

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} まで段階希釈した。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. 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

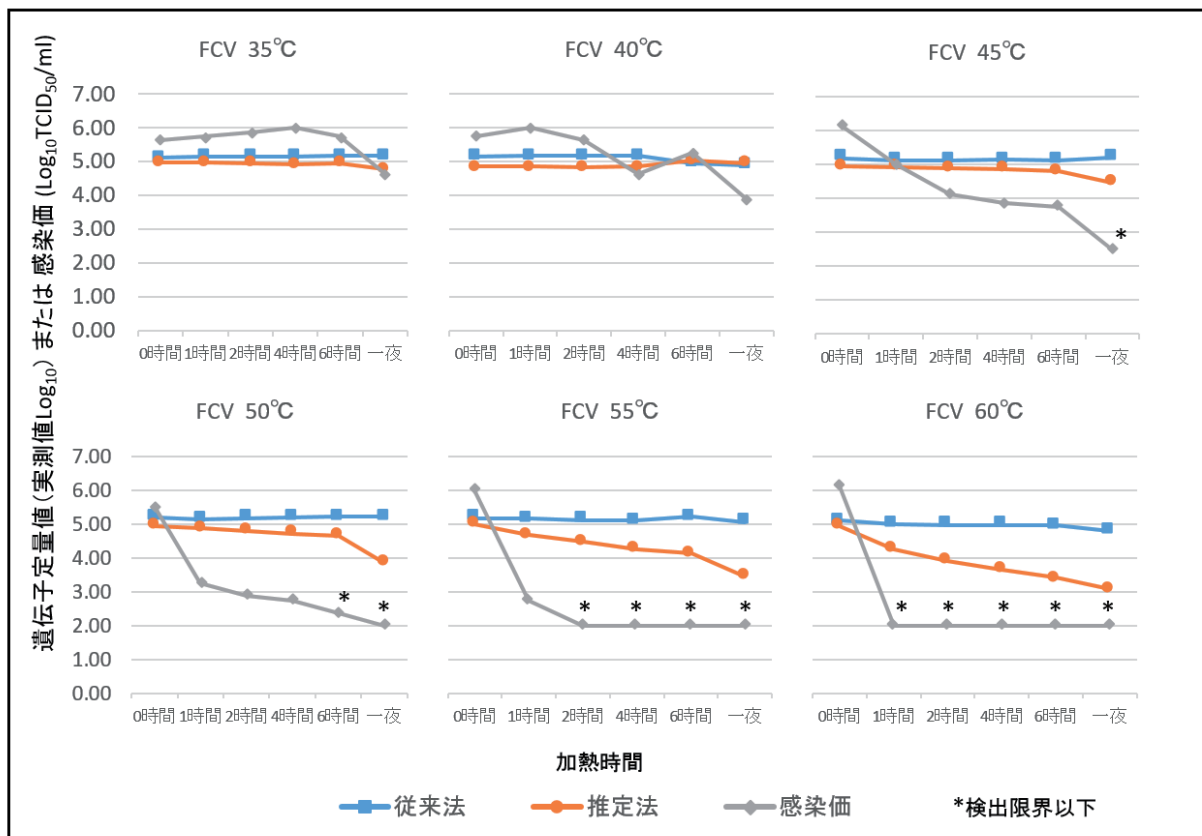


図1 各加熱温度における遺伝子定量値または感染価の変化(FCV)

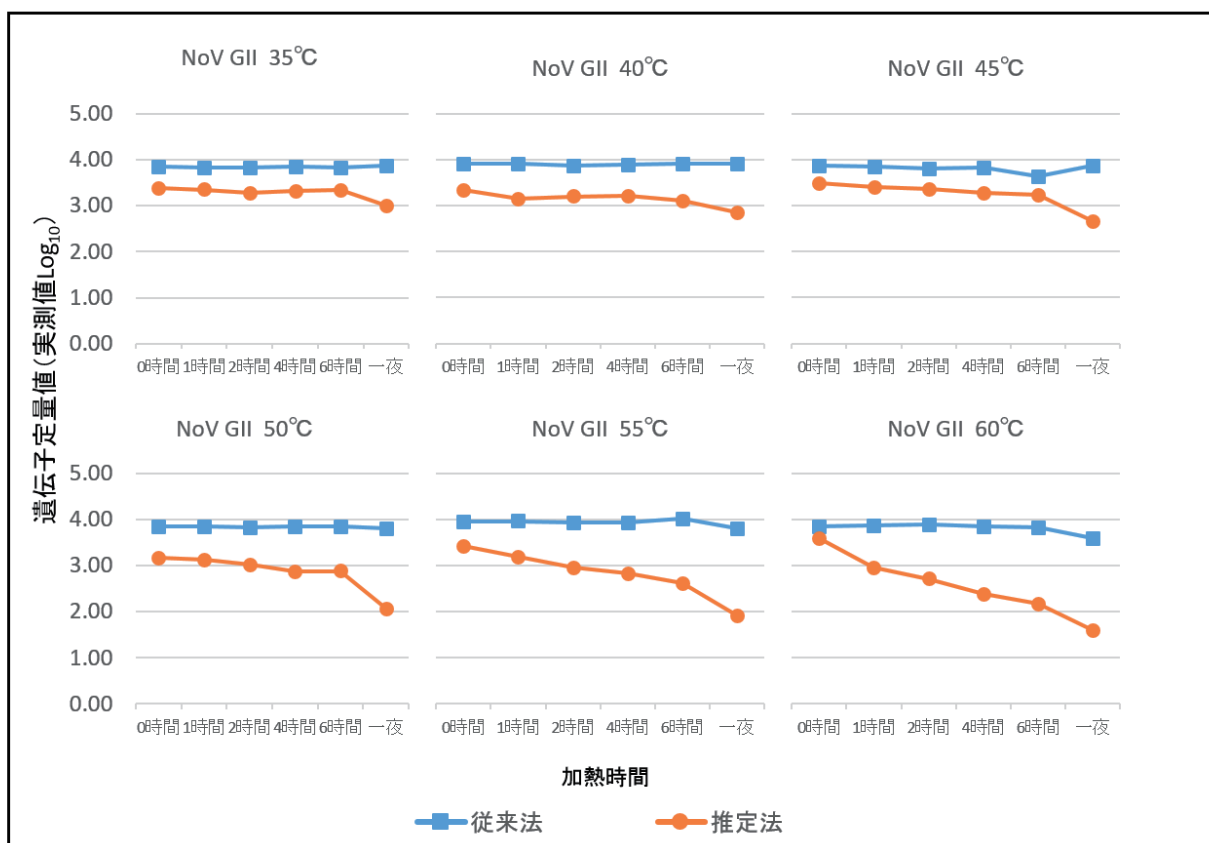


図2 各加熱温度における遺伝子定量値の変化(NoV GII)

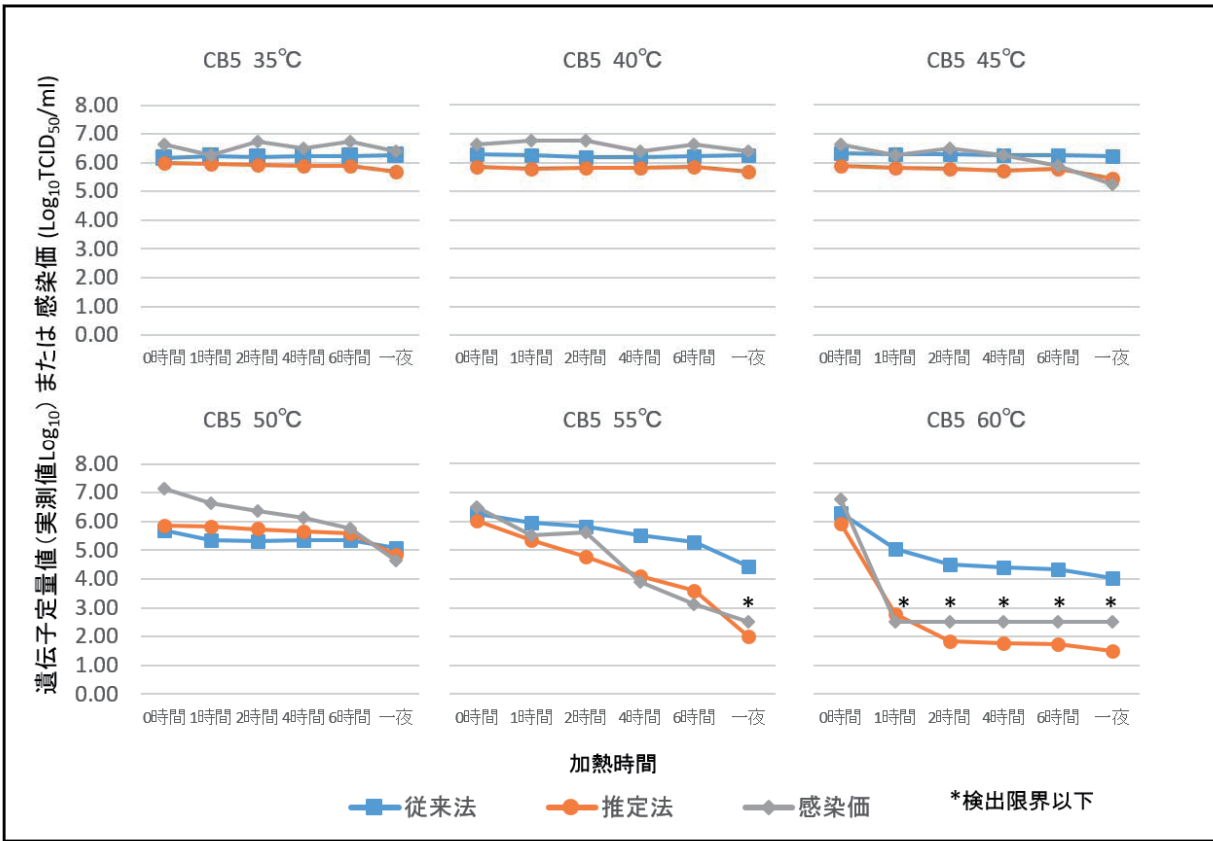


図3 各加熱温度における遺伝子定量値または感染価の変化(CB5)

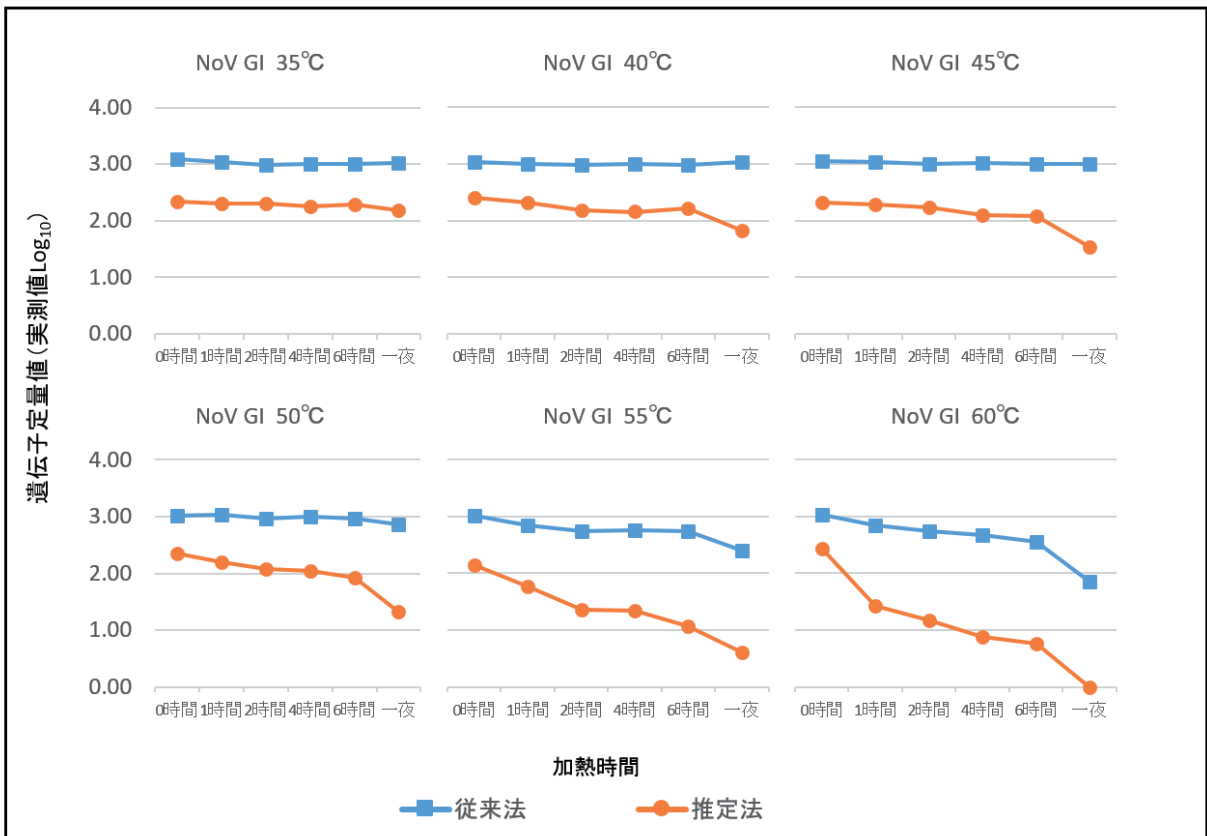


図4 各加熱温度における遺伝子定量値の変化(NoV GI)

平成 28 年度厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)
「ウイルスを原因とする食品媒介性疾患の制御に関する研究」
研究分担報告

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. 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

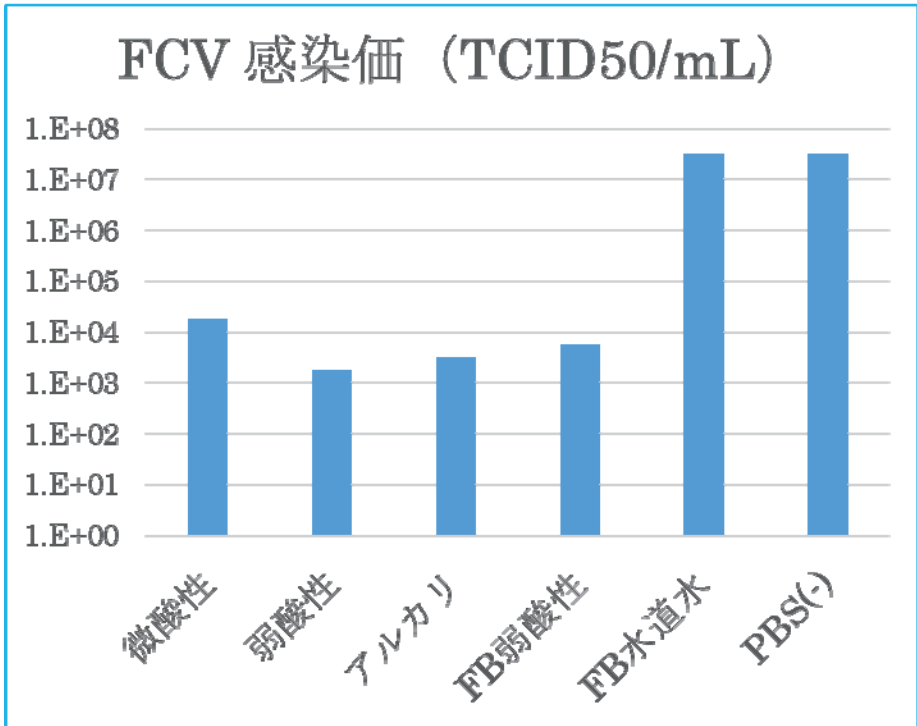


図 1：各種消毒剤等による FCV の不活化

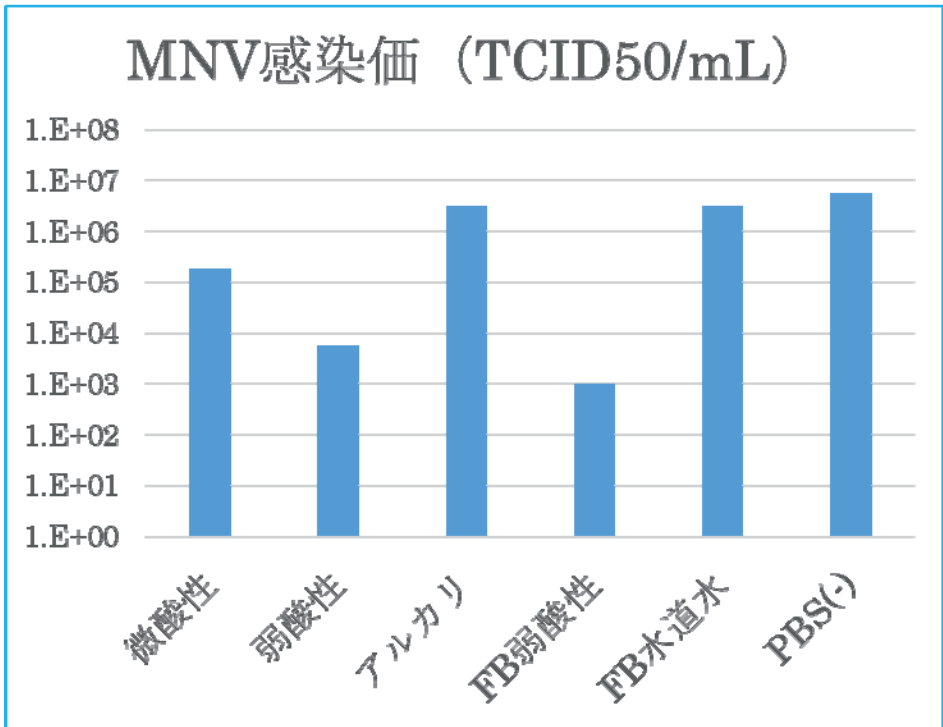


図 2：各種消毒剤等による MNV の不活化

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(log ₁₀)を 1 に減少させるのに必要な時間(分)							
			3	4	5	6	7	8	9	10
56°C	FCV	6.715	21.0	27.0	34.0	41.0	48.0	54.0	61.0	68.0
	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

平成 28 年度厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)
「ウイルスを原因とする食品媒介性疾患の制御に関する研究」
研究分担報告

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 50μ 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。

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 50μ 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。

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(Na₂CO₃)、過酸化水素水(H₂O₂)、及び過炭酸ナトリウム(Na₂CO₃・H₂O₂)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 士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 calisivirus 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 と比較しても物性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かに課題を残すところである。 Na_2CO_3 単体では同じ calisivirus 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

で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.

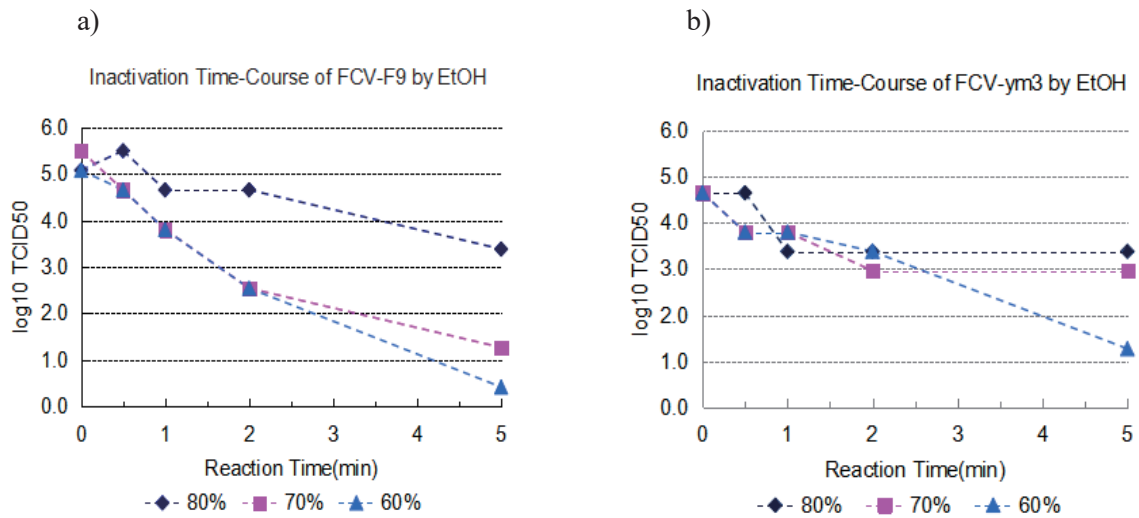


図 2. 局方消毒用エタノール IP(EtOH-IP)による EV71 不活性化効果

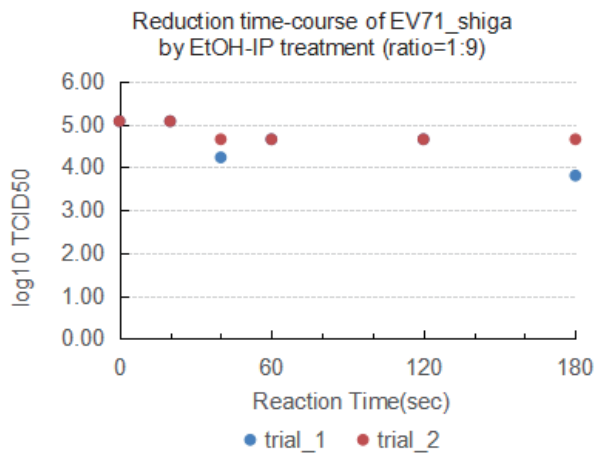


図 3. 局方消毒用エタノール IP(EtOH-IP)による hPoVs 不活性化効果

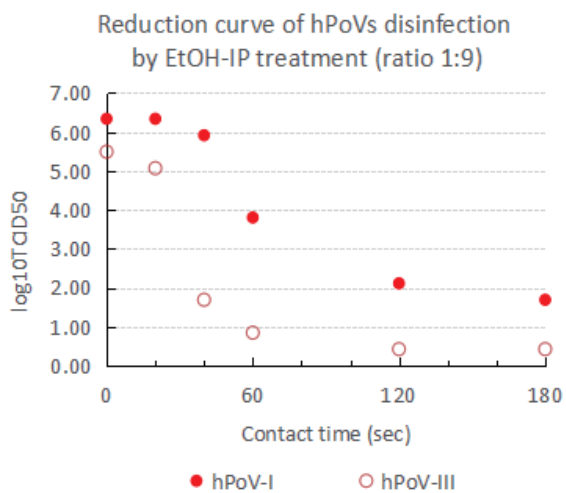


図4. H₂O₂ 溶液による FCV 及び MNV の不活性化効果

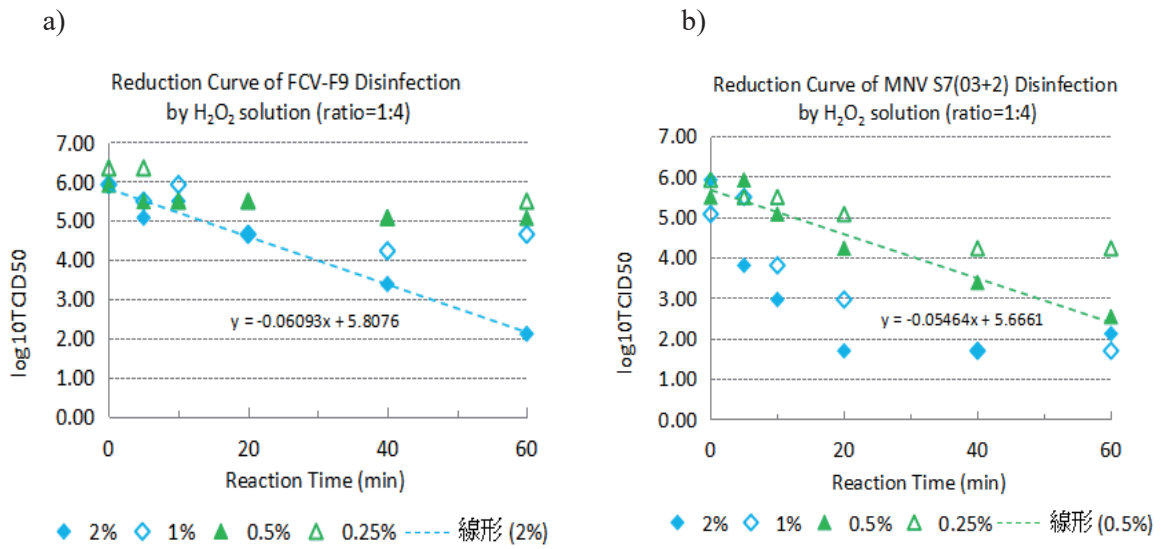


図5. Na₂CO₃ 及び Na₂CO₃・H₂O₂(perCO₃Na₂)による FCV 及び MNV の不活性化効果

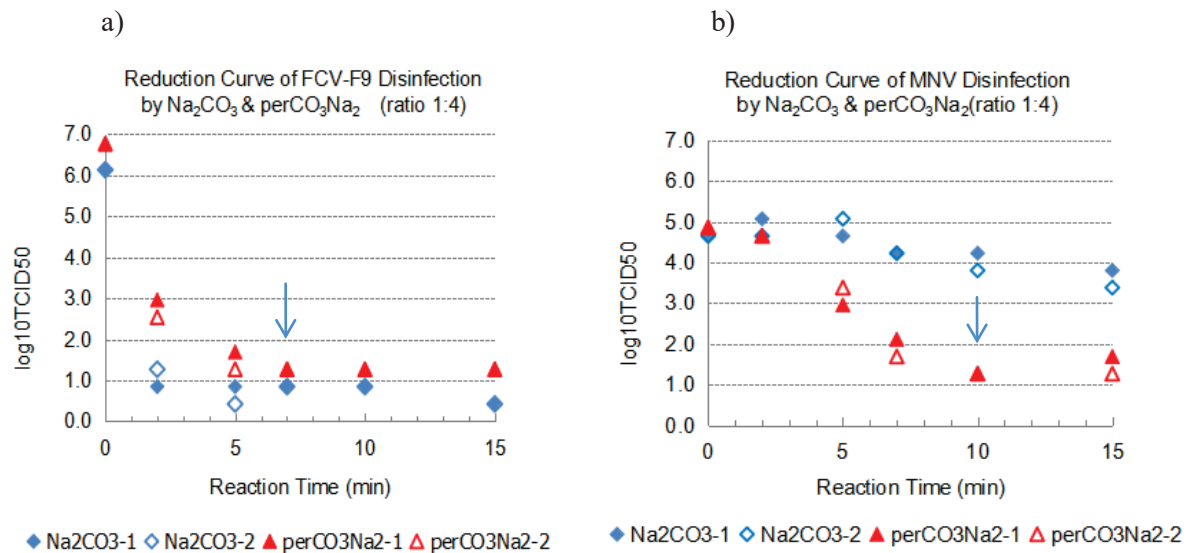


図6. 各種エタノール製剤(non-envelope virus 対応品)による EV71 の不活性化効果

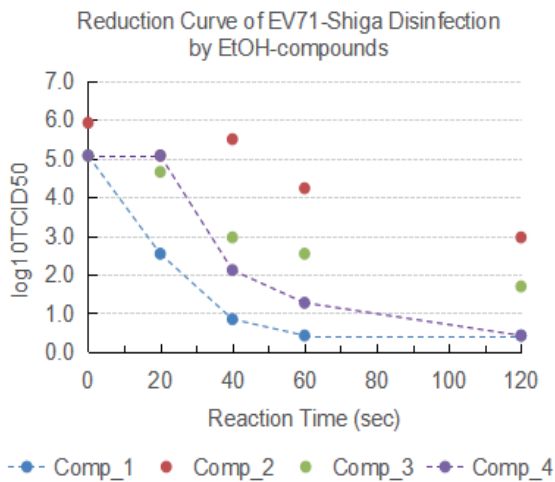


図 7. 除菌用エタノール製剤(雑品、pH3.7、EtOH 62.5%v/v)による各種ウイルスの不活性化効果

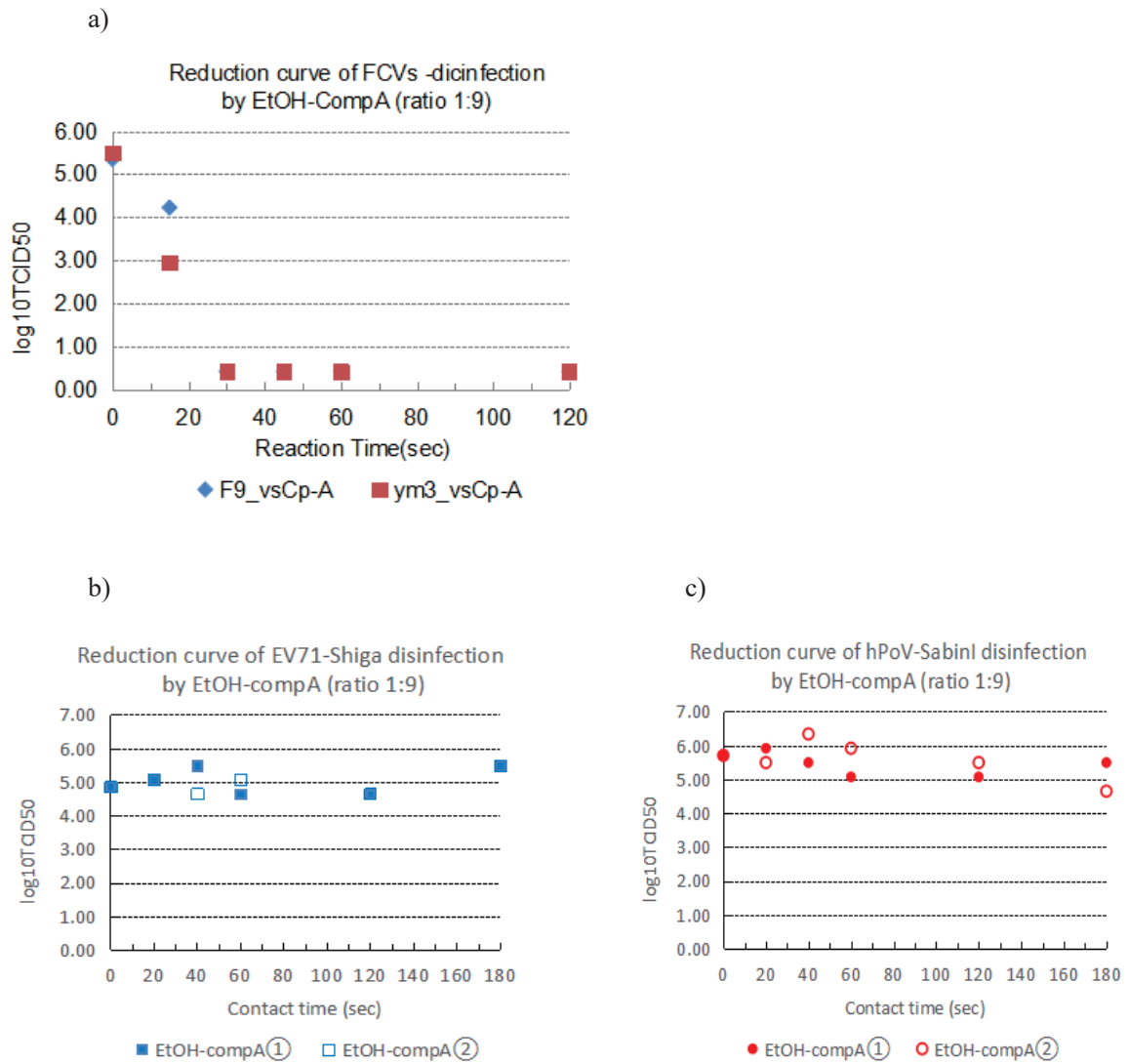


表 1. NaClO 200±ppm 処理による供試ウイルス感染価の経時的変化

ウイルス 反応時間	FCV-F9	FCV-ym3	MNV-S7	EV71_Shiga	hPoV_SabI
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

平成 28 年度厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)
「ウイルスを原因とする食品媒介性疾患の制御に関する研究」
研究分担報告

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 細胞捲種を行う。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 4×10^5 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

平成 28 年度厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)
「ウイルスを原因とする食品媒介性疾患の制御に関する研究」
研究協力報告

北海道で発生した食中毒事例の分子疫学的解析

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

研究要旨

ノロウイルス (NoV) の流行状況を把握するため、平成 28 年度に北海道で発生した集団胃腸炎について、検出された NoV の遺伝子型別を行った。4~6 月の優勢遺伝子型は GII.Pe_GII.4 Sydney 2012 であったが、11 月以降は GII.P16_GII.2 が優勢となった。GII.P16_GII.2 の検出は、感染症事例では主に低年齢層の事例(保育所・幼稚園、小学校)で認められた。12 月以降は、食中毒事例からの検出も GII.P16_GII.2 のみであった。

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 NoV 遺伝子の塩基配列を比較し、一致するかどうかを確認している。比較には RT-PCR の検出用プライマー内の配列(RdRp 領域:約 290nt、RdRp-VP1 領域:約 340nt)を用いているが、この領域の配列の一致が同一感染源によるとの判断を裏付ける情報として十分なものかどうかを確認するため、より長い配列(RdRp 領域:793nt、VP1 領域全長:1,623-1,629nt)を用いて比較を行った。その結果、食中毒の同一事例内では、RT-PCR の検出プライマー内の配列が一致する検体は、より長い配列を用いて比較してもほぼ一致することが示された。

A. 研究目的

ノロウイルス (NoV) はヒトに急性胃腸炎を引き起こす代表的なウイルスであり、食中毒の病因物質としても重要視されている。今回は、平成 28 年度に北海道で発生した NoV による食中毒事例を対象として、以下の調査を実施した。

1. NoV 感染は主にヒト-ヒト感染により

拡大する。NoV 感染者の数が多くなるほど、二枚貝の NoV 汚染や調理従事者を介した食品汚染のリスクが高くなると考えられることから、NoV の流行状況の把握は食中毒予防の観点からも重要である。そこで、北海道で発生した NoV による食中毒および感染症事例について、検出された NoV の分子疫学的解析を行い、NoV の流行と食

中毒への関与について検討を行った。

2. 北海道における食中毒事例の NoV 検査では、患者、調理従事者、食品等から検出された NoV 遺伝子について塩基配列を決定し、配列が一致するかどうかの確認を行っている。この一致・不一致の情報、疫学的解析による同一感染源かどうかの判断の裏付けとして使用される。しかし、ここで比較しているのは RT-PCR の検出用プライマー内の配列であり、これは RdRp 領域の一部（約 290bp）と RdRp-VP1 領域の一部（約 340bp）の配列情報に過ぎない。そこで、この領域における配列の一致が同一感染源によるもの判断を裏付ける情報として十分なものであったかどうかを確認するため、食中毒と判断された事例の調理従事者および患者由来の NoV について、それぞれの領域のより長い配列を決定し、比較検討を行った。

B. 研究方法

1. 材料

1) NoV の流行状況の把握

北海道において 2016 年 4 月から 2017 年 1 月の間に発生した食中毒 7 事例（表 1）と感染症およびその他（食中毒とも感染症とも判断されなかった感染経路不明の事例）の 45 事例を対象とした。

2) 調理従事者および患者由来 NoV の塩基配列の比較

北海道において 2016 年 4 月から 2017 年 1 月の間に発生した食中毒 7 事例のうち、表 1 に示す No. 3, 4 の 2 事例は道立保健所管轄外で発生したものであり、当所での検査は患者についてのみであった。

今回の調査では、当所において調理従事者と患者の検査を実施した 4 事例（表 1、事例 No. 1, 2, 5, 6）を対象とし、それぞれの事例について、すべての NoV 陽性検体を用いた。

2. 方法

1) 検出された NoV の遺伝子型別

厚生労働省通知の方法に準じて NoV 遺伝子の増幅を行った。増幅プライマーには、RdRp 領域の P1/P3 および NV82・SM82/NV81、RdRp-VP1 領域の COG1F/G1-SKR および COG2F/G2-SKR の 4 セットを使用した。得られた PCR 産物について、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定した。RdRp 領域の遺伝子型別は Norovirus Genotyping Tool (<http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool>) を、VP1 領域の遺伝子型別は Norovirus Genotyping Tool と近隣結合法による系統樹解析を併用した。

2) 調理従事者および患者由来 NoV の塩基配列の決定

ORF3 の VP2 領域に設定したプライマーを用いて cDNA を合成した。これを鋳型として、RdRp 領域に設定された NV82 改変プライマー (1st) および P1 改変プライマー (nested) と、VP2 領域に設定した 2 種類のプライマーを用いて Nested PCR を行った。Nested PCR の増幅産物について、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定した。今回の検討に使用する塩基配列は、P1 プライマーより下流の RdRp 領域 (793nt) と VP1 領域全長 (1,623-1,629nt) とした。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

1. 北海道における NoV の検出状況

表 2 に、集団胃腸炎事例からの NoV 検出状況を、食中毒と感染症・その他の事例とに分けて示した。

検出 NoV の VP1 遺伝子型は、感染症・その他の事例では、2015/16 シーズンにあたる 4~6 月は GII. 4 が優勢であり、他に GII. 2 と GII. 17 が検出された。2016/17 シーズンは 11 月に入って事例が急増し、優勢遺伝子型は GII. 2 であった。次いで GII. 6 が多く検出され、その他、GII. 4 と GII. 17 の検出がみられた。食中毒は 10 月から毎月発生しており、10 月の 1 事例からは GII. 17、11 月の 2 事例からはそれぞれ GII. 4、GII. 17 が検出された。12 月以降は 4 事例の発生があり、すべての事例から GII. 2 が検出された。

GII. 2 の RdRp 遺伝子型は、6 月までに検出された株は GII. P2 であったが、11 月以降の株は GII. P16 であった。GII. 4 の亜型はすべて Sydney 2012 であり、RdRp 遺伝子型はほとんどが GII. Pe であったが、5 月に高齢者施設において検出された 1 株が GII. P16 であった。

表 3 に、原因または発生施設別の NoV 検出状況を、2015/16 シーズン (4~8 月) と 2016/17 シーズン (9 月~翌年 1 月) に分けて示した。2015/16 シーズン (4~8 月) は、保育所・幼稚園、病院・高齢者施設ともに GII. 4 が優勢遺伝子型であった。2016/17 シーズン (9 月~翌年 1 月)

の優勢遺伝子型は GII. 2 であり、主に低年齢層 (保育所・幼稚園、小学校) の感染症事例から検出され、食中毒事例からの検出頻度も高かった。

2. 調理従事者および患者由来 NoV の塩基配列の一致・不一致についての検証

食中毒 4 事例について、調理従事者と患者から検出された NoV の塩基配列の比較結果を図 1 に示した。今回の検証に用いた塩基配列は図 1 の太矢印で示した領域のものであり、GII. 17 は 2, 396nt (RdRp 領域の一部 : 793nt、VP1 領域全長 : 1, 623nt)、GII. 2 は 2, 402nt (RdRp 領域の一部 : 793nt、VP1 領域全長 : 1, 629nt) である。また、行政検査時の比較は P1/P3 および COG2F/G2-SKR のプライマー内の配列であり (それぞれ 286nt、338nt)、これらの領域を細矢印で示した。

事例 No. 1 は、行政検査時の比較領域では、すべての検体で塩基配列が 100%一致した。一方 VP1 全長の比較では、患者 1 検体で 1 カ所、A→R (A と G の混合) への置換がみられた。A→G の置換は、非同義置換であった。

事例 No. 2 も、行政検査時の比較領域は、すべての検体で塩基配列が 100%一致した。NoV 陽性 4 検体のうち、調理従事者 2 は今回の検証用の比較領域についてシーケンスに十分な量の増幅ができなかったため、今回は調理従事者 1 検体と患者 2 検体についての比較とした。VP1 全長の比較において、患者 1 で 1 カ所、A→R (A と G の混合) への置換があり、患者 2 でも 1 カ所、T→Y (T と C の混合) への置換がみられた。どちらも非同義置換であった。

事例 No. 5 の行政検査時の塩基配列の比較では、VP1 領域はすべての検体で塩基配列が 100%一致したが、RdRp 領域は患者 1 検体で 1 カ所、A→R (A と G の混合) への置換があった。この他、VP1 全長を比較すると、別の患者 1 検体で 1 カ所、G→A への置換がみられた。これらはどちらも同義置換であった。

事例 No. 6 は、行政検査時の比較領域では、すべての検体で塩基配列が 100%一致した。RdRp 領域のより長い配列と VP1 全長を比較した場合でも、塩基配列は全ての検体で 100%一致した。

D. 考察

1. 北海道における NoV の検出状況

食中毒事例において検出された NoV の遺伝子型は、2016 年 12 月および 2017 年 1 月に発生した 4 事例すべてで GII.P16_GII.2 であった。この GII.P16_GII.2 は、食中毒以外の事例では主に低年齢層の事例の優勢遺伝子型であった。北海道における食中毒事例からの検出遺伝子型は、同時期の低年齢層主体の流行遺伝子型と一致することは少なく、食中毒事例では GII.4 や、最近では GII.P17_GII.17 が主に関与する傾向がみられていた。そのため、2016/17 シーズンの食中毒発生に GII.P16_GII.2 が大きく関与していることは興味深く、成人における病原性（不顕性感染の多さなど）や感受性（免疫状況）の情報を含めた解析が必要と考えられた。

II.P16_GII.2 に次いで多く検出された遺伝子型は GII.P7_GII.6 であったが、II.P16_GII.2 が道内全域で検出されて

いるのに対し、II.P7_GII.6 の検出は 1 保健所管内のみであった。また平成 28 年度に検出された GII.4 Sydney 2012 株の RdRp 遺伝子型は、1 株のみ GII.P16 であった。このタイプは、北海道では同年 3 月にも検出されており、検出はこの 2 事例のみである。

2. 調理従事者および患者由来 NoV の塩基配列の一致・不一致についての検証

今回対象とした食中毒 4 事例は、行政検査時に、調理従事者および患者から検出された NoV の塩基配列が一致すること（100%一致と 1 塩基違いの混合も含む）を確認していた事例である。これらの事例では、長い配列の比較でも、検体の多くが 100%一致した。3 事例において一部患者検体に配列の違いが確認されたが、違いは 1 検体につき 1 カ所であり、その多くは他の検体と同じ塩基と異なる塩基との混合であった。このことから、食中毒事例内の検体の比較においては、RT-PCR の検出用プライマー内の短い配列情報（RdRp および VP1 領域の一部）を用いた結果が、その領域全体の一致・不一致の状況から大きくは逸脱しないと考えられた。今後は、食中毒事例内の比較データをさらに蓄積するとともに、同時期発生の同遺伝子型検出事例間の比較を行い、感染源の異なる事例間の比較ではどの程度の配列の不一致がみられるかについて情報を収集する予定である。

E. 結論

平成 28 年度の北海道における NoV 検出は、6 月までは GII.4 優勢、11 月以降は GII.2 優勢であった。II.2 の RdRp 遺伝

子型は、6月まではすべて GII.P2、11月以降はすべて GII.P16 であった。 GII.P16_GII.2 は、11月から保育所・幼稚園・小学校を中心に流行がみられ、また、12月以降に発生した食中毒事例はすべて GII.P16_GII.2 によるものであった。

食中毒事例の調理従事者および患者から検出された NoV の塩基配列を比較すると、RT-PCR の検出プライマー内の配列が一致する同一事例内の検体は、VP1 全長など、より長い配列を用いて比較してもほぼ一致した。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

表 1 食中毒事例の概要

事例 No.	発生年月	原因施設	原因食品	検査結果 (NoV陽性数/検査数)			検出NoV VP1遺伝子型
				原因施設		患者	
				調理従事者	その他		
1	2016/10	飲食店	提供された食品	1/4	1/1	7/8	GII.17
2	2016/11	飲食店	提供された食品	2/5	-	2/2	GII.17
3	2016/11	飲食店	提供された食品	-	-	14/16	GII.4.2012
4	2016/12	飲食店	提供された食品	-	-	1/1	GII.2
5	2017/ 1	飲食店	提供された弁当	2/4	1/1	8/8	GII.2
6	2017/ 1	飲食店	提供された食品	1/12	0/1	6/6	GII.2
7	2017/ 1	パン製造所	パン	4/11	-	8/8	GII.2

表2 北海道で発生した集団胃腸炎事例からの NoV 検出状況

A. 食中毒

検出遺伝子型		事例発生月									
VP1	RdRp	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月
GII.2	GII.P16	-	-	-	-	-	-	-	-	1	3
GII.4_2012	GII.Pe	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-
GII.17	GII.P17	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-

B. 感染症・その他

検出遺伝子型		事例発生月									
VP1	RdRp	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月
GII.2	GII.P2	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-
	GII.P16	-	-	-	-	-	-	-	12	2	2
GII.4_2012	GII.Pe	1	4	2 ^{※1}	-	-	-	1	2	1	1
	GII.P16	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
GII.6	GII.P7	-	-	-	-	-	-	-	6 ^{※2}	1	-
GII.17	GII.P17	2	-	-	-	-	-	1	3	-	-

※1 このうち1事例は、1検体から GII.P2_GII.2 検出

※2 このうち1事例は、1検体から GII.P16_GII.2 検出

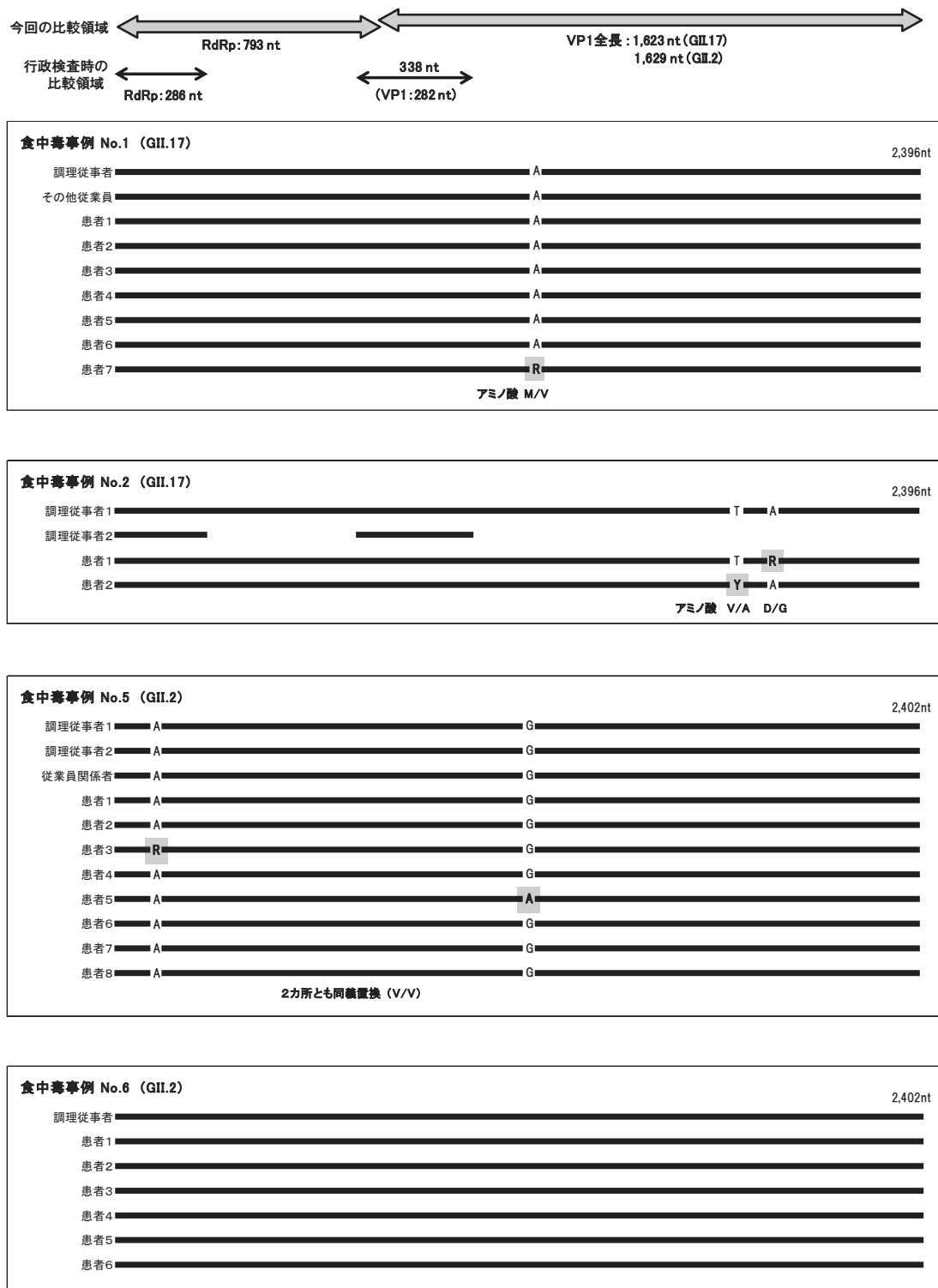
表3 原因または発生施設別にみた NoV 検出状況

検出遺伝子型		2016年4月～8月					2016年9月～2017年1月				
		食中毒	感染症・その他				食中毒	感染症・その他			
RdRp	保育所 幼稚園		小学校	病院 高齢者施設	その他	保育所 幼稚園		小学校	病院 高齢者施設	その他	
GII.2	GII.P2	-	1	-	-	2	-	-	-	-	-
	GII.P16	-	-	-	-	-	4	11	2	1	2
GII.4_2012	GII.Pe	-	5 ^{※1}	-	2	-	1	3	-	1	1
	GII.P16	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
GII.6	GII.P7	-	-	-	-	-	-	4 ^{※2}	-	-	3
GII.17	GII.P17	-	-	-	2	-	2	-	1	1	2

※1 このうち1事例は、1検体から GII.P2_GII.2 検出

※2 このうち1事例は、1検体から GII.P16_GII.2 検出

図1 調理従事者と患者から検出されたNoVの塩基配列の比較



平成 28 年度厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)
「ウイルスを原因とする食品媒介性疾患の制御に関する研究」
研究協力報告

青森県における集団胃腸炎事例から検出されたノロウイルスの
分子疫学解析 (2013/14～2015/16 シーズン)

研究協力者	筒井 理華	青森県環境保健センター
研究協力者	坂 恭平	青森県環境保健センター
研究協力者	菩提寺 誉子	青森県環境保健センター
研究分担者	野田 衛	国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

2013 年 9 月～2016 年 8 月 (2013/14～2015/16 シーズン) までに青森県内 (青森市を除く) で発生した集団胃腸炎事例のうち、ノロウイルスが検出された 49 事例の遺伝子解析を行った。調理従事者が関与した食中毒事例は 6 事例であり、そのうち 5 事例 (事例番号 23 を除く) の発症者便と調理従事者便等の塩基配列の相同性は 100%であった。事例番号 23 は、塩基配列が 1 塩基異なる検体が見られたが、アミノ酸置換が見られなかったことや系統樹解析の結果から遺伝学的な変異は見られなかったと推測された。

A. 研究目的

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

調理従事者の関与が疑われる事例において、発症者と調理従事者等から同一の病原体を検出することは、食中毒と断定するための有力な根拠となる¹⁾。一方、発

症者と調理従事者等から検出された NoV のシーケンス解析の結果、シーケンサーによる塩基配列の読み違いあるいはウイルスの変異により 1 ヲ所の塩基に 2 種類の塩基のピークが見えたり、塩基配列に変異が認められる場合がある。

今回、2013/14～2015/16 シーズンに青森県内 (青森市を除く) で発生した NoV による集団胃腸炎事例について、分子疫学的に検討したので報告する。

B. 研究方法

1. 材料

2013/14～2015/16 シーズンに青森県内 (青森市を除く) で発生した NoV による

集団胃腸炎事例 49 事例のうち青森県環境保健センターが検査した 1,377 検体（糞便 798、吐物 7、拭き取り 393、食品 179）を用いた（表 1）。感染地が県外であると推定される事例は除いた。

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

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

3. 遺伝子解析

Nested PCR 産物を QIAquick PCR Purification Kit で精製し、BigDye Terminator Kit (ABI PRISM) で BigDye 反応後、DNA ダイレクトシークエンサー ABI PRISM310 (Applied Biosystems) または Applied Biosystems® 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて遺伝子解析を行った。DNA ダイレクトシークエンス解析法により NoV Capsid 領域の塩基配列を決定し (GI : 260nt、GII : 279nt)、得られた塩基配列を塩基配列解析ソフトウェア Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) version6²⁾ を用い、Kimura 2-parameter model を用いた ML (Maximum-Likelihood) 法で系統樹を作成した。系統樹の信頼性の評価には bootstrap 法 (反復回数 1000) を用いた。標準株は文献³⁾に記載の株を使用した。

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

C. 研究結果

2013/14～2015/16 シーズンに発生し、

NoV が検出された集団胃腸炎事例の概要を表 1 に示した。全 49 事例中食中毒として行政的に断定された事例は、表 1 に黄色およびオレンジ色で示した 14 事例であった（事例番号 2、3、5、7、14、17、21、23、25、28、29、34、40、46）。食中毒と断定された 14 事例のうち調理従事者が関与した事例は、表 1 にオレンジ色で示した 6 事例であった（事例番号 2、7、17、23、28、29）。

調理従事者が関与した 6 事例は、発症者、非発症者及び調理従事者等便（陽性数/検体数：104/163 検体）、吐物（1/5 検体）、拭取り（5/60 検体）から NoV 遺伝子が検出されたが、食品（0/7 検体）からは検出されなかった。

調理従事者が関与した 6 事例について、NoV 陽性検体の遺伝子解析を行ったところ、発症者便・発症者吐物・調理従事者等便 94 検体、拭取り 5 検体について NoV 遺伝子型を同定することができた（表 1）。遺伝子群別では、6 事例全てが GII であった。この 6 事例の NoV の ML 法による系統樹を図 1 に示した。事例の配列名には各事例内で遺伝子配列が同じである検体数を記載した。備考として発症者便、発症者吐物、調理従事者、拭取りの検出数を記載した。

系統樹解析の結果、NoV GII. 4 は 4 事例（事例番号 2 の一部、7、17、29）で、全て GII. 4 Sydney/2012 と同じクラスターに分類された（図 1）。また、NoV GII. 13 は 1 事例（事例番号 28 の一部）、NoV GII. 17 は 3 事例（事例番号 2 の一部、23、28 の一部）であった。

これら 6 事例から検出された NoV の塩

塩基配列を事例ごとに比較した（解析塩基 279nt）。事例番号 2 では NoV GII. 4（27 検体）と GII. 17（1 検体）が検出され、発症者便（21 検体）、調理従事者便（2 検体）および拭取り（4 検体）から検出された NoV GII. 4 の塩基配列は 100%一致した。事例番号 7 では発症者便（18 検体）、発症者吐物（1 検体）、調理従事者便（1 検体）および拭取り（1 検体）から NoV GII. 4（21 検体）が検出され、それらの塩基配列は 100%一致した。事例番号 17 では発症者便（4 検体）および調理従事者便（2 検体）から NoV GII. 4（6 検体）が検出され、それらの塩基配列は 100%一致した。事例番号 23 では NoV GII. 17（18 検体）が検出され、その塩基配列は 2 つ、すなわち、①発症者便（14 検体）および調理従事者便（2 検体）、②発症者便（2 検体）に分けられた。①の 138 番目の塩基配列（aa138）はシトシン（C）、②の aa138 はチミン（T）で、①と②は 1 塩基異なり相同性は 99.6%であった。①と②にアミノ酸置換は見られなかった。事例番号 28 では NoV GII. 13（15 検体）と GII. 17（1 検体）が検出され、発症者便（13 検体）および調理従事者便（2 検体）から検出された NoV GII. 13 の塩基配列は 100%一致した。事例番号 29 では、発症者便（7 検体）および調理従事者便（3 検体）から NoV GII. 4（10 検体）が検出され、それらの塩基配列は 100%一致した。

一方、異なる事例から検出された NoV の塩基配列を比較すると、事例番号 2、7、17、29 から NoV GII. 4/sydney/2012 株に属する株が検出されたが、事例番号 2、7、17 に由来する株の塩基配列は一致し、事

例番号 29 に由来する株とは 3 塩基異なった。

D. 考察

2013/14～2015/16 シーズンに発生した NoV が検出された集団胃腸炎事例は 49 事例あり、そのうち食中毒と断定された事例は 14 事例であった。そのうち、調理従事者が関与した食中毒事例は 6 事例であった。

事例番号 2、7、17、28、29 は、遺伝子解析の結果、それぞれの事例において、検出された同じ遺伝子型の NoV の塩基配列は全て一致したため、食中毒と断定するための有力な根拠であったと推察された。

事例番号 23 は NoV の遺伝子解析ができた全ての株が NoV GII. 17 と型別されたが、塩基配列が 1 ヶ所異なる 2 種類（①、②；aa138 : C ⇔ T）の塩基配列が見られた。①の発症者便 14 検体と調理従事者便 2 検体の塩基配列（279nt）は完全に一致し、②の発症者便 2 検体の塩基配列（279nt）は完全に一致した。①でシーケンスによって得られた波形データを解析したところ、①では主として C が検出され、若干ではあるが T が含まれていた検体が見られた。一方、②では主として T が検出され、1 検体は若干ではあるが C が含まれていた。他の 1 検体は T と C が同程度の波形が見られた。2 種類の波形が見られた数検体は、シーケンサーが塩基配列の読み違いを起こす程度の塩基のピークは見られず、塩基配列は 1 ヶ所異なっていたが、アミノ酸置換が見られなかったことや系統樹解析の結果から遺伝学的な変

異は見られなかったと推測された。②の1検体の結果からシーケンサーが塩基配列の読み違いを起こす可能性が示唆された。

今回は同一事例内で異なる塩基配列が検出されたのは1事例のみであったが、シーケンサーが塩基配列の読み違いを起こす場合や遺伝学的な変異が発生する場合など、塩基配列が1塩基異なる可能性があるため、今後も引き続きデータを蓄積し、解析する必要がある。

E. 結論

1. 食中毒事例49事例中、調理従事者が関与した食中毒事例は6事例であった。
2. 5事例（事例番号23を除く）の発症者便と調理従事者便等の塩基配列の相同性は100%であった。
3. 事例番号23は、塩基配列が1塩基異なる検体が見られた。

F. 文献

- 1) 国立感染症研究所感染症疫学センター：ノロウイルス等検出状況。
(<http://www.nih.go.jp/niid/ja/iasr-noro.html>)
- 2) Tamura, K., Stecher, G., Peterson,

D., Filipinski, A. & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30, 2725-2729.

- 3) 片山和彦：ノーウォークウイルス（ノロウイルス）の遺伝子型（2015年改訂版）。病原微生物検出情報,
(<http://www.nih.go.jp/niid/ja/norovirus-m/norovirus-iasrs/5913-pr4274.html>)

G. 健康危害情報

なし

H. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

J. 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 青森県内(青森市を除く)で発生した NoV による集団胃腸炎事例
(2013/14~2015/16 シーズン)

シーズン	事例No.	施設分類	発生日	検出病原体	遺伝子型	ふん便		吐物		拭き取り		食品	
						陽性数	検査数	陽性数	検査数	陽性数	検査数	陽性数	検査数
2013/14	H25												
	1	ツアー旅行	H25.9.6	NoVGII	GII.4	1	2						
	2	宿泊施設	H25.12.15	NoVGII	GII.4 (発症者22名のうち解析に用いたのは21名、調理従事者2名、拭取り4)、GII.17 (調理従事者1名)	25	53			4	17		
	3	小学校	H25.12.8	NoVGII	GII.4	16	22			0	16	0	7
	4	飲食店	H25.12.20	NoVGII	GII.4 (発症者2名、調理従事者1名)	3	5			0	8		
	5	飲食店	H25.12.20	NoVGI・NoVGII	G1解析不能(発症者3名)、GI.13(発症者2名)、GII解析不能(発症者3名、従業員1名)、GII.4(発症者4名)、GII.8(発症者3名)、GII.17(発症者5名)、GII.13(発症者2名)、G1解析不能・GII.8(発症者1名)	24	38			0	11	0	3
	6	飲食店	H25.12.29	NoVGII	GII.4	6	11			1	9		
	7	飲食店	H26.1.15	NoVGII	GII.4 (発症者25名のうち解析に用いたのは18名、発症者吐物1名、調理従事者1名、拭取り1)	26	32	1	5	1	13		
	8	宿泊施設	H26.1.29	NoVGII	GII.4	1	9			1	12		
	9	保育所	H26.1.25	NoVGII	GII.4 (先生1名、園児2名)、GII.6 (園児6名)	9	13			0	10	0	12
	10	家庭	H26.1.23	NoVGII	GII.4	4	7			0	11		
	11	保育所	H26.2.21	NoVGII	GII.2	4	7			0	4	0	13
12	小学校	H26.3.6	NoVGII	GII.6	5	5							
2014/15	H26												
	13	老人福祉施設	H26.4.12	NoVGII	GII.4	6	11			0	8		
	14	飲食店	H26.4.12	NoVGI	GII.4、大腸菌	1	27						
	15	老人福祉施設	H26.5.10	NoVGII	GII.4	2	2						
	16	宿泊施設	H26.5.16	NoVGI	GII.2	1	31			0	4	0	7
	17	給食施設	H26.5.15	NoVGII	GII.4 (発症者4名、調理従事者2名)、GII解析不能(発症者1名)	7	13			0	5	0	7
	18	披露宴	H26.5.28	NoVGII	GII.6	17	31			1	41	0	1
	19	家庭	H26.6.19	NoVGI	GII.4	4	4						
	20	飲食店	H26.9.17	NoVGI	GII.7	1	10						
	21	飲食店	H26.12.8	NoVGII	GII.17	3	9			0	8		
	22	仕出し店	H26.12.21	NoVGII	GII.4(調理従事者1名)、GII.17(発症者5名)	6	35			0	14	0	2
	23	飲食店	H26.12.31	NoVGII	GII.17(発症者16名、調理従事者4名のうち解析に用いたのは2名)	20	24			0	13		
24	老人福祉施設	H27.1.6	NoVGII	GII.4	1	2							
25	飲食店	H27.1.11	NoVGII	GII.17	17	28			0	19			
26	老人福祉施設	H27.1.27	NoVGII	GII.4	5	10			0	9			
27	高校	H27.2.9	NoVGII	GII.4	4	5							
28	高校	H27.2.9	NoVGII	GII.13(発症者13名、調理従事者2名)、GII.17(調理従事者1名)	16	30			0	6			
29	老人福祉施設	H27.2.12	NoVGII	GII.4(発症者7名、調理従事者3名)	10	11			0	6			
30	宿泊施設	H27.3.12	NoVGII	GII.17、GII.13	3	12			1	23			
31	飲食店	H27.3.12	NoVGII	GII.17、GII.13	3	25							
2015/16	H27												
	32	老人福祉施設	H27.5.1	NoVGII	GII.17	4	4						
	33	飲食店?	H27.6.3	NoVGI	GII.3	7	8						
	34	保育園	H27.10.17	NoVGII	GII.3	10	13			0	3	0	24
	35	老人福祉施設	H27.12.14	NoVGII	GII.3	1	1	0	1	0	4		
	36	宿泊施設	H27.12.18	NoVGII	GII.3	10	32			0	5	0	4
	37	保育園	H28.1.19	NoVGII	GII.4(発症者7名、調理従事者1名)	8	11			0	5	0	12
	38	葬儀会社	H28.2.1	NoVGII	GII.3	5	28	0	1	0	10	0	2
	39	飲食店	H28.1.31	NoVGI・NoVGII	GII.7、GII.17	1	3			0	15	0	2
	40	飲食店	H28.2.6	NoVGII	GII.4	7	8			0	11		
	41	幼稚園	H28.2.16	NoVGII	GII.17(発症者11名、調理従事者1名)	12	16			0	14	0	8
	42	飲食店	H28.2.19	NoVGII	GII.17	1	1					0	1
43	老人福祉施設	H28.2.16	NoVGII	GII.17	2	15			0	8	0	9	
44	老人福祉施設	H28.2.21	NoVGII	GII.17(発症者5名、調理従事者2名)	7	23			0	10	0	33	
45	老人福祉施設	H28.3.7	NoVGII	GII.17	3	5			0	8	0	9	
46	飲食店	H28.3.19	NoVGII	GII.17	23	43			0	5	0	1	
2015/16	H28												
	47	障害者支援施設	H28.4.12	NoVGII	GII.17	5	18			0	9	0	3
	48	馬肉販売店	H28.4.26	NoVGII	GII.17	4	9						
	49	自衛隊施設	H28.7.2	NoVGII	GII.3、GII.17	6	36			0	19	0	19
検体合計						367	798	1	7	9	393	0	179
調理従事者が関与した食中毒6事例の検体数						104	163	1	5	5	60	0	7

表中の ■ は食中毒事例を、■ は調理従事者が関与した食中毒事例を示す。

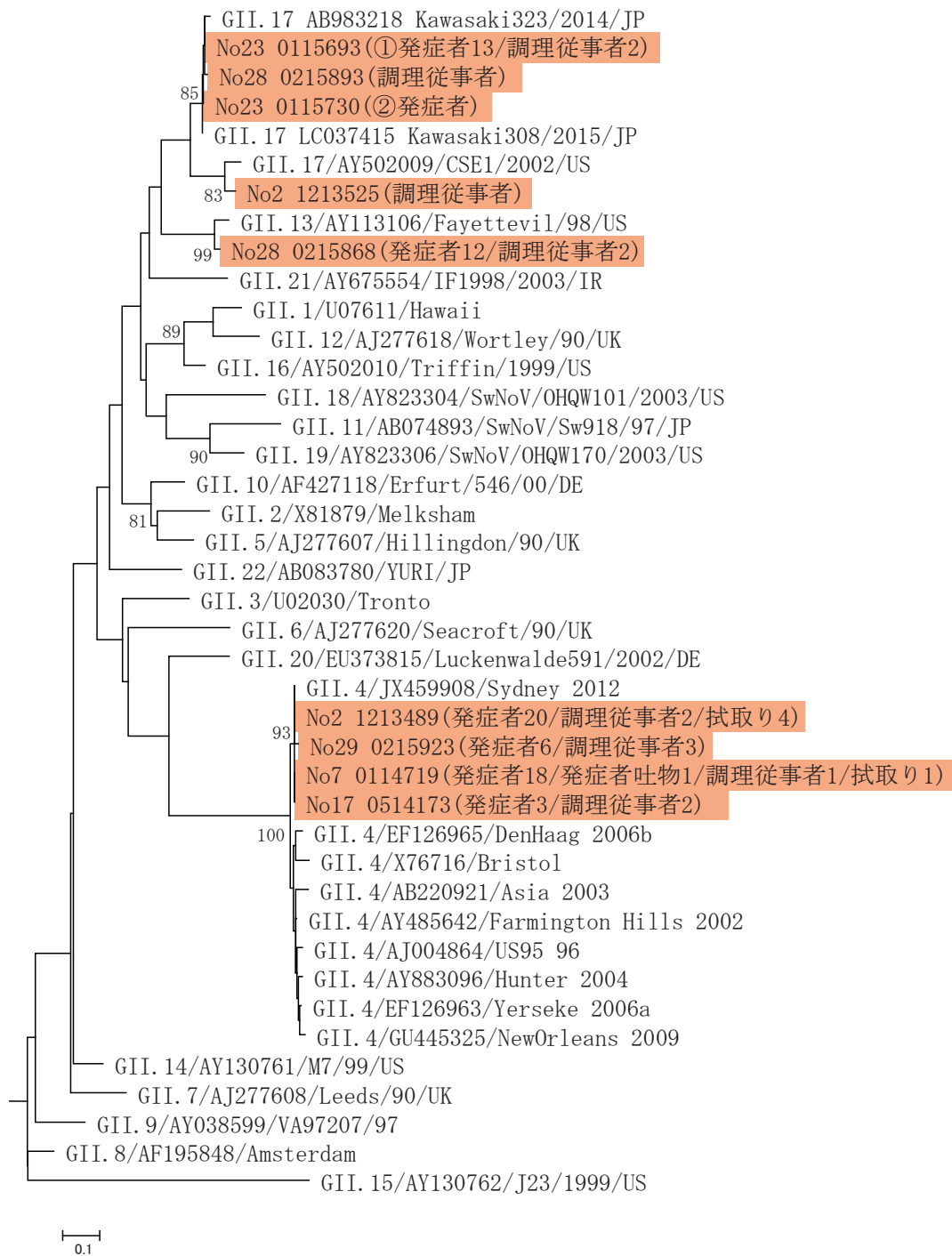


図 1 2013/14 ～2015/16 シーズン集団胃腸炎事例のうち調理従事者が関与した食中毒事例から検出された NoVG II の系統樹(279nt)

配列名:表 1 の事例番号。 は調理従事者が関与した食中毒事例を示す。

平成 28 年度厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)
「ウイルスを原因とする食品媒介性疾患の制御に関する研究」
研究協力報告

感染性胃腸炎集団発生におけるノロウイルス検出状況

研究協力者	佐藤 直人	岩手県環境保健研究センター
研究分担者	野田 衛	国立医薬品食品衛生研究所
研究協力者	高橋 雅輝	岩手県環境保健研究センター
研究協力者	梶田 弘子	岩手県環境保健研究センター

研究要旨

ノロウイルスによる食中毒予防の基礎資料とすることを目的として、2015/16 シーズンに当センターに依頼のあった集団発生事例等を対象に、ノロウイルスの検出および解析を試みた。38 事例について検査を実施した結果、GII.4_Sydney2012 が 12 事例 (33.3%) と最も多く、次いで GII.17 が 11 事例 (30.6%)、GII.3 が 9 事例 (25.0%) と、この 3 つの遺伝子型の合計が全体の 9 割近くを占めた。施設別では、保育所が 17 事例 (47.2%) と最も多く、次いで高齢者施設 5 事例 (13.9%)、飲食店 4 事例 (11.1%) であった。施設別の遺伝子型の検出状況では、保育所において GII.3 が多く検出された。食中毒事例からは GII.17 が多く検出され、同株の系統樹解析を行った結果、GII.P17-GII.17/ Kawasaki308 株と近縁であることが確認された。

A. 研究目的

ノロウイルス (NoV) は冬季の食中毒および感染性胃腸炎の主な起因ウイルスの 1 つである。毎年、ノロウイルスによる食中毒やヒト-ヒト感染 (疑い) による感染性胃腸炎の集団発生が多発し、その発生を防止するための対策が求められている。有効な対策を講じるためには、食中毒や集団発生の状況を詳しく把握することが不可欠である。ノロウイルスによる食中毒および感染性胃腸炎集団発生の予防に資することを目的に、ノロウイルスの検出状況を調査したので報告する。

B. 研究方法

1. 材料

2015/16 シーズン (2015 年 9 月～2016 年 8 月) に当センターに検査依頼のあった食中毒 4 事例、有症苦情 3 事例、感染性胃腸炎集団発生 31 事例の計 38 事例から得られた糞便検体を対象とした。

2. 検査方法

NoV の検出は、平成 19 年 5 月 14 日付け食安監発第 0514004 号厚生労働省通知に準じて実施した。糞便に滅菌した PBS (-) を加え 10% 乳剤にした後、12000rpm20 分

間遠心後、上清から QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)を用いて RNA を抽出した。RNA 抽出後、High Capacity cDNA Reverse Transcription kit を用いて cDNA を合成し、リアルタイム RT-PCR 法により NoV の検出を行った。NoV が検出された検体について、COG2F/G2SKR プライマーセットを用いた PCR 法により Capsid 領域を増幅した。増幅産物 (276bp) はダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定し、Norovirus genotyping tool (<http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool#/>) を用いて遺伝子型を同定し、MEGA ver6.0 を用いて最尤法による系統樹解析を行った。また、NoV GII.17 が検出された検体について、Yuri22F/G2SKR プライマーセットを用いた PCR 法により Polymerase 領域を増幅し、上記と同様に遺伝子型別を行った。

(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

38 事例について検査を実施した結果、36 事例 (94.7%) から NoV が検出された。NoV が検出された 36 事例のうち GI が 1 事例 (2.7%)、GII が 35 事例 (97.2%) と GII が大半を占めた。

遺伝子型別では、GII.4_Sydney2012 が 12 事例 (33.3%) と最も多く、次いで GII.17 が 11 事例 (30.6%)、GII.3 が 9 事例 (25.0%) と、この 3 つの遺伝子型の合計が全体の 9 割近くを占めた (図 1)。

遺伝子型の月別の発生状況では、シー

ズン前半の 11 月～12 月は GII.3 が主流であったが、年明け以降 GII.17 および GII.4 が多く検出された。

施設別では、保育所が 17 事例 (47.2%) と最も多く、次いで高齢者施設 5 事例 (13.9%)、飲食店 4 事例 (11.1%) であった。

施設別遺伝子型別の発生状況では、保育所においては GII.3、高齢者施設では GII.4 Sydney_2012 がそれぞれ最も多く検出された。また、食中毒 4 事例中 3 事例から GII.17、1 事例から GII.4 Sydney_2012 がそれぞれ検出された。

GII.17 が検出された 11 事例について、Capsid 領域の系統樹解析を行った結果、10 株が Kawasaki308 株、1 株が Kawasaki323 株と同じクラスターに分類された。また、上記 11 事例からコピー数の多い数株を選定し Polymerase 領域の遺伝子型別を行った結果、遺伝子型は全て GII.P17 であった。

D. 考察

岩手県において、2015/16 シーズンに検査依頼のあった食中毒および感染性胃腸炎集団発生事例から、GII.4_Sydney2012、GII.17、GII.3 が多く検出された。全国における検出状況においても同様の傾向がみられることから、同シーズンは上記の 3 つの遺伝子型が広範に流行したことが推察された。

施設別の検出状況では、保育所において GII.3 が多く検出された。過去 3 シーズンにおける全国での GII.3 の検出状況はやや低い報告数で推移しており、GII.3 に対する低年齢層の感受性者の増加が今

回の流行の要因と考えられた。

GII.17 について解析した結果、GII.P17-GII.17/ Kawasaki308 株に近縁の株であることから、2014/15 シーズンに全国で流行が認められた株が今シーズンも流行していることが明らかになった。本株は食中毒事例から多く検出される傾向があることから、今後の流行状況を注意深く監視する必要があると考えられる。

E. 結論

岩手県において、2015/16 シーズンは GII.4_Sydney2012、GII.17、GII.3 が多く検出された。検出された GII.17 は、GII.P17-GII.17/ Kawasaki308 株と近縁

であった。

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

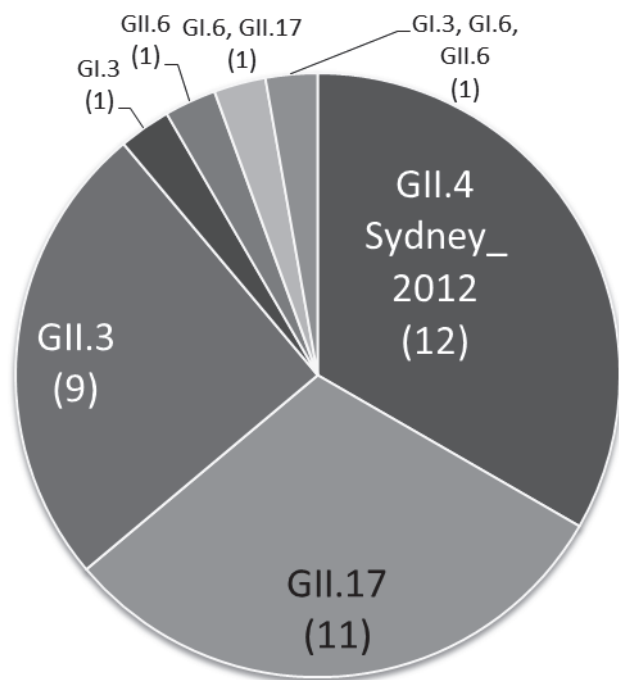


図1 遺伝子型別ノロウイルス集団事例数（カッコ内は事例数）

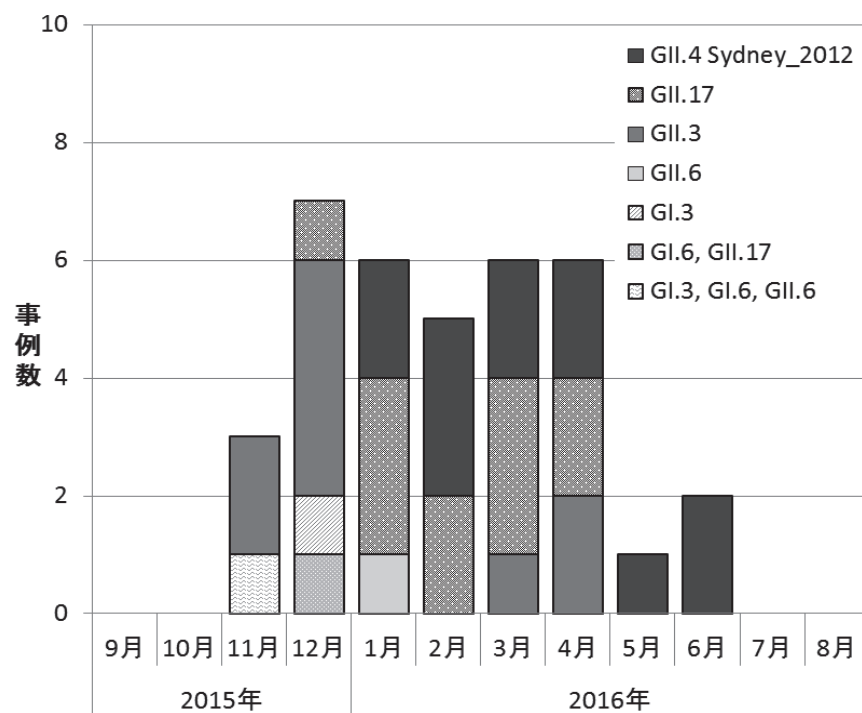


図2 月別遺伝子型別ノロウイルス集団事例の発生状況

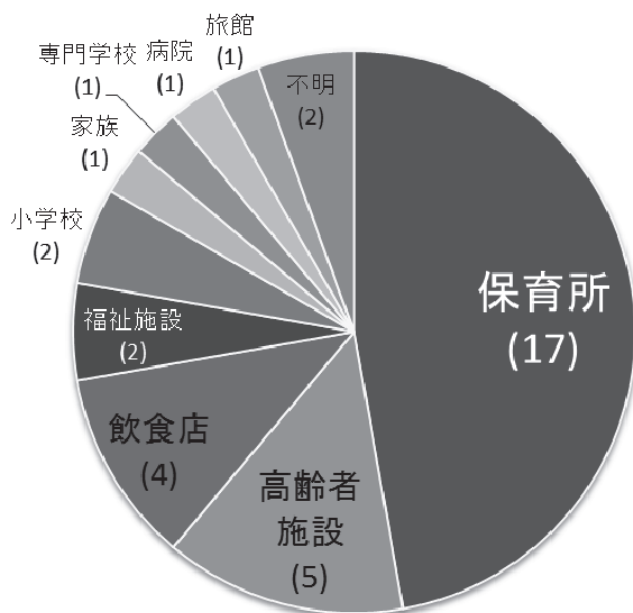


図3 施設別ノロウイルス集団事例の発生状況（カッコ内は事例数）

表 1. 施設別遺伝子型別の発生状況

施設	遺伝子型							計
	GII.4 Sydney 2012	GII.17	GII.3	GI.3	GII.6	GI.6、GII.17	GI.3、GI.6、GII.6	
保育所	4	2	8	1	1	1		17
老人福祉施設	4	1						5
飲食店	2(1)	2(2)						4
障がい者福祉施設		2						3
小学校	1		1					2
家族		1						1
専門学校							1	1
病院	1							1
旅館		1						1
不明		2(1)						1
計	12(1)	11(3)	9	1	1	1	1	36

(): 食中毒事例再掲

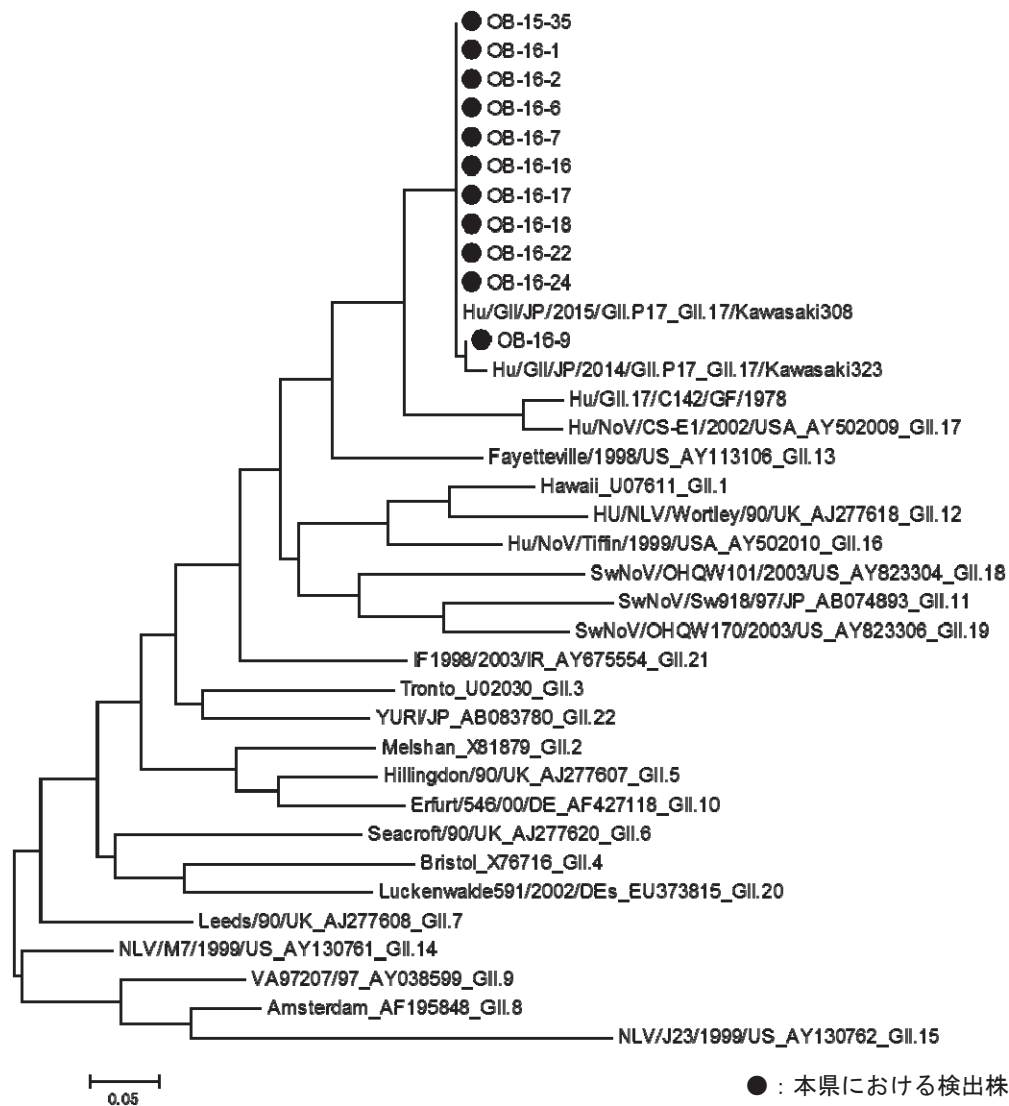


図 4 ノロウイルス GII.17 の Capsid 領域の分子系統樹

平成 28 年度厚生労働科学研究費補助金・食品の安全確保推進研究事業
「ウイルスを原因とする食品媒介性疾患の制御に関する研究」
研究協力報告書

秋田県における二枚貝からのノロウイルス・サポウイルスの検出と
感染性胃腸炎患者からのノロウイルス・サポウイルスの検出状況

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

研究要旨

2016 年に秋田県で流通した生食用カキおよび殻付き生アサリについて、ノロウイルス (NoV)、サポウイルス (SaV) の検出を行った。1 月に購入した生カキは、NoV GII が 3 海域から、NoV GI が 2 海域から検出され、遺伝子型は GII. 3、GII. 17、GI. 2、GI. 4 が確認された。パック充填の浮遊液については、1 海域から NoV GII. 17 が検出された。2 月に購入した生カキからは、NoV の GII. 4 Sydney 2012 亜型、GII. 17、GI. 2、GI. 4 が検出された。3 月に購入したアサリからは、NoV の GII. 6 と GI. 7 が検出された。1 月～3 月に購入した生カキおよびアサリの SaV は、不検出であった。10 月、11 月、12 月に購入した生カキについては、12 月購入分から NoV の GII. 2 と GII. 3 が検出された。同時期に購入したアサリについては、NoV の GII. 2 が 11 月購入分以降に確認され、NoV の GI. 7 が 12 月購入分より検出された。

2016 年の秋田県における食中毒事例 3 事例はすべてが NoV GII の感染であり、検出された遺伝子型は GII. 4 Sydney 2012 亜型と GII. 17 であった。集団感染事例において検出された NoV の遺伝子型は、GII. 2 が最も多く、その検出時期は 10 月～12 月であった。感染症発生動向調査においては、NoV GII. 4 Sydney 2012 亜型の検出が最も多かった。次いで多く確認された NoV GII. 2 の検出時期は、11 月～12 月であった。SaV は、GI. 1 と GII. 3 が散発的に検出された。

今回の結果から、秋田県で流通している二枚貝の NoV、SaV の汚染実態が明らかとなり、検出された遺伝子型は市中の流行状況に反映されているものと考えられた。

A. 研究目的

カキ等二枚貝の生食および加熱不十分な状態での喫食は、ノロウイルス等によ

るウイルス性胃腸炎を引き起こす原因と考えられている。今回、二枚貝の汚染状況を把握するため、秋田県内で流通して

いる生食用カキおよび殻付き生アサリについてノロウイルス（NoV）、サポウイルス（SaV）の検出を行った。

また、秋田県において2016年に感染性胃腸炎患者から検出されたNoV、SaVの状況についても併せて報告する。

B. 研究方法

1. 材料および対象

1) 市販生カキ

① 2016年1月購入分

2016年1月30・31日に秋田市内で購入した国産の生カキを用いた。生食用3県4海域（ロット）を各2パックずつ用意し、カキの中腸腺2～4個分を1検体として、1パックにつき2～3検体（合計：22検体）の検出を行った。また、パックに充填されている浮遊液についてもロットごとにNoVのみ検出を行った。

② 2016年2月購入分

2016年2月22日に秋田市内で購入した国産の生カキを用いた。生食用1県1海域（ロット）を1パック用意し、カキの中腸腺1個分を1検体として、6検体の検出を行った。

③ 2016年10月、11月、12月購入分

2016年10月15日、11月25日、12月17日に秋田市内で購入した国産の生カキを用いた。10月、11月は生食用1県1海域（ロット）を1パック、12月は生食用2県2海域（ロット）を各1パックずつ用意し、カキの中腸腺2～4個分を1検体として、1パックにつき2～3検体（合計：11検体）についてNoVのみ検出を行った。なお、10月、11月、12月の1パックについては同じ業者で加工された同一海域の

カキを選択し、経時変化も確認した。

2) 市販殻付き生アサリ

①2016年3月購入分

2016年3月7日に秋田市内で購入した国産の殻付き生アサリを用いた。1県1海域（ロット）を1パック用意し、パックに入っていたアサリの中腸腺（40個分）を合わせ1検体としてNoVのみ検出を行った。また、アサリは検査実施まで冷凍にて保存していたが、解凍の際に得られた液（解凍液）についてもNoVの検出を行った。

②2016年10月、11月、12月購入分

2016年10月16日、11月25日、12月17日に秋田市内で購入した国産の殻付き生アサリを用いた。各月、1県1海域（ロット）を1パック用意し、パックに入っていたアサリの中腸腺（10月：26個分、11月：29個分、12月：24個分）を合わせて各月1検体ずつとし、NoVのみ検出を行った。なお、アサリはすべて同じ店舗にて、同一産地のものを購入し、経時変化も確認した。

3) 食中毒事例および集団感染事例

2016年1月～12月にウイルスが検出された食中毒事例3事例とNoV、SaVが検出された集団感染事例31事例を集計対象とした（中核市である秋田市分の事例は除く）。

4) 感染症発生動向調査

病原体定点医療機関において2016年1月～12月に小児科から採取された糞便検体310検体のうちNoV、SaVが検出された52検体を集計対象とした。

2. 方法

1) 市販生カキおよび殻付き生アサリからのウイルス検出

厚生労働省通知法（平成 19 年 5 月 14 日付け食安監発第 0514004 号）「貝の中腸腺を用いた方法（超遠心法）」に準じ濃縮を行い、QIAamp Viral RNA Mini Kit（QIAGEN）により核酸を抽出した。抽出時にはニッポンジーンの「DNaseI（RT Grade）」を用い、オンカラム DNaseI 処理を実施した。その後、NoV は Kojima らの方法（J. Virol. Methods, 100, 107-114, 2002.）により、SaV は Kitajima らの方法（Appl. Environ. Microbiol., 76, 2461-2467, 2010.）により RT-PCR を行い、陽性検体の一部については Capsid N/S 領域遺伝子を増幅し、ダイレクトシーケンスにて塩基配列を決定した。GII.4 Sydney 2012 亜型については、日本遺伝子研究所の「ノロウイルス GII.4 Sydney 2012 変異株検出用プライマーセット」を使用し、判定した。

2) 糞便検体からのウイルス検出

糞便乳剤から QIAamp Viral RNA Mini Kit（QIAGEN）により核酸を抽出した。その後、NoV は Kageyama らの方法（J. Clin. Microbiol., 41, 1548-1557, 2003.）により、SaV は Oka らの方法（J. Med. Virol., 78, 1347-1353, 2006.）によりリアルタイム RT-PCR を行い、陽性検体については Capsid N/S 領域遺伝子を増幅し、ダイレクトシーケンスにて塩基配列を決定した。

（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. 市販生カキおよび殻付き生アサリからのウイルス検出状況

1) 1 月購入分の市販生カキ（表 1）

3 海域から NoV GII が検出された。検出された NoV GII の遺伝子型は、GII.3 と GII.17 であった。また、NoV GI は 2 海域から検出されたが、そのうち 1 海域から検出された NoV GI については型別不能であった。確認された NoV GI の遺伝子型は GI.2 と GI.4 であった。SaV はすべての海域において不検出であった。浮遊液については、中腸腺からの検出率が高かった 1 海域から NoV GII が検出され、遺伝子型は GII.17 であった。

2) 2 月購入分の市販生カキ（表 2）

すべての検体から NoV GII が検出された。検出された NoV GII の遺伝子型は、GII.4 Sydney 2012 亜型と GII.17 であった。NoV GI は 5 検体から検出され、検出された NoV GI の遺伝子型は GI.2 と GI.4 であった。

3) 3 月購入分の殻付き生アサリ（表 3）

NoV の GII.6 と GI.7 が検出され、SaV は検出されなかった。解凍液の NoV は不検出であった。

4) 10 月、11 月、12 月購入分の市販生カキおよび殻付き生アサリ（表 4）

経時変化の確認を実施した 10 月、11 月、12 月の生カキ（同一 1 海域）については、12 月購入分から NoV GII.2 が検出された。また、12 月のみ購入の生カキ 1 海域からは、NoV GII.3 が検出された。NoV GI は不検出であった。経時変化の確認を実施した 10 月、11 月、12 月の殻付き生アサリについては、11 月、12 月購入分か

ら NoV GII.2 が検出され、また、12 月購入分からは NoV GI.7 も検出された。

2. 食中毒事例におけるウイルスの検出状況

食中毒事例の詳細について表 5 に示す。3 事例すべてが NoV GII の感染であり、遺伝子型は GII.4 Sydney 2012 亜型と GII.17 が確認された。3 事例中 1 事例は、GII.4 Sydney 2012 亜型と GII.17 が同時に検出された。

3. 集団感染事例における NoV の遺伝子型別検出状況

集団感染事例において検出された NoV の遺伝子型について表 6 に示す。10 月以降、GII.2 の検出が増加し、19 例 (61.3%) と最も多かった。次いで、GII.17 が 7 例 (22.6%) で 1 月～5 月の検出であった。GII.4 Sydney 2012 亜型は 3 例 (9.7%) 確認され、GII.6 と GI.3 はそれぞれ 1 例 (3.2%) から検出された。2016 年の集団感染事例において SaV は検出されなかった。

4. 感染症発生動向調査における NoV、SaV の遺伝子型別検出状況

感染症発生動向調査において検出された NoV、SaV の遺伝子型について表 7、表 8 に示す。NoV は GII.4 Sydney 2012 亜型が 22 例 (46.8%) と最も多く、その検出時期は流行期である 1 月がピークとなっており、その後は散発的に確認された。また、GII.17 の 6 例 (12.8%) は、集団感染事例の検出状況と同様に 1 月～5 月の検出であり、GII.2 の 13 例 (27.7%) は 11 月以降に確認された。GII.3 は 4 例 (8.5%)、GI.2 は 2 例 (4.3%) で、いずれも散発的に検出された。SaV は検出数が

少なく、検出遺伝子型は GII.3 が 4 例 (80.0%)、GI.1 が 1 例 (20.0%) で散発的に認められた。

D. 考察

二枚貝による食中毒事例が多発していた 2014/2015 シーズン (平成 27 年度報告書参照) に比べ、2016 年は秋田県内において食中毒事例が大幅に減少した。しかしながら、1 月、2 月購入の市販生カキからは、2014/2015 シーズンに引き続き NoV GII.17 が多く検出され、また、カキの流通が増加する 1 月以降に感染症発生動向調査および食中毒・集団感染事例においても NoV GII.17 の検出数が多くなっている。昨年の調査と同様に、県内で流通した生カキの喫食により、NoV GII.17 の感染および不顕性感染が引き起こされ、感染の契機となっていた可能性も考えられた。今回、カキの浮遊液から NoV が検出されたことは、調理時における汚染拡大の原因となり得る危険性を示唆しており、注意喚起を促すひとつのデータとして重要な結果であると考えられる。市販殻付き生アサリからの NoV の検出は、アサリの加熱不足による喫食が、家庭内等での感染を引き起こし、そこから伝播する可能性も懸念されると思われた。アサリは本来、加熱することが前提の食材であるが、調理の方法によっては加熱不十分な状態で提供される可能性も考えられるため、注意が必要である。秋田県内で生カキが店頭に並び始めた 10 月以降のカキおよびアサリからは、NoV GII.2 と GII.3 が検出された。特に GII.2 は、2016/2017 シーズンに検出数が多くなっているとの

報告があり（病原微生物検出情報 Vol. 38 No. 1）、本県の感染症発生動向調査および集団感染事例においても10月以降に多く検出されている。購入した生カキおよび殻付き生アサリは秋田県が産地となっていないことから、海域周辺でも本県同様の時期に流行が始まったものと考えられる。また、2016年に秋田県内でNoV GII.2が検出された集団感染19事例は、すべて保育園および幼稚園での発生であった。免疫が未熟である低年齢層への感染拡大が懸念され、今後の動向に注視する必要があると考える。

E. 結論

市販生カキおよびアサリからのNoV、SaVの検出は、秋田県内におけるウイルスの侵淫状況に反映されているものと考えられ、検出される遺伝子型も市中の流行と相関するものと思われた。また、今回、検査を試みた生カキの浮遊液やアサリからのNoVの検出は、食品の取り扱いを考える上でも重要な結果であり、今後もデータを蓄積しながら、感染予防に向けての啓発や注意喚起に役立てていく必要があると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 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)

2. 学会発表

1) 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

2) 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

3) 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

4) 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

5) 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

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 市販生カキからのウイルス検出状況（1月購入）

海域	No.	ノロウイルス		サポウイルス	浮遊液
		G II型	G I型		
A-21	①-1	GII.17	(-)	(-)	ノロウイルス GII.17
	①-2	GII.17	(-)	(-)	
	①-3	GII.17	GI.2	(-)	
	②-1	GII.17	検出	(-)	
	②-2	GII.17	(-)	(-)	
	②-3	GII.17	GI.4	(-)	
C-1	③-1	(-)	(-)	(-)	(-)
	③-2	(-)	GI.NA	(-)	
	④-1	(-)	(-)	(-)	
	④-2	(-)	(-)	(-)	
B-9	⑤-1	(-)	(-)	(-)	(-)
	⑤-2	GII.17	(-)	(-)	
	⑤-3	GII.17	(-)	(-)	
	⑥-1	(-)	(-)	(-)	
	⑥-2	(-)	(-)	(-)	
	⑥-3	(-)	(-)	(-)	
B-5	⑦-1	GII.17	(-)	(-)	(-)
	⑦-2	(-)	(-)	(-)	
	⑦-3	(-)	(-)	(-)	
	⑧-1	GII.3	(-)	(-)	
	⑧-2	GII.17	(-)	(-)	
	⑧-3	(-)	(-)	(-)	

表 2 市販生カキからのウイルス検出状況（2月購入）

海域	No.	ノロウイルス		サポウイルス
		G II型	G I型	
A-30	1	GII.17	GI.2	(-)
	2	GII.17	GI.4	(-)
	3	GII.17	GI.2	(-)
	4	GII.4*、GII.17	GI.4	(-)
	5	GII.17	(-)	(-)
	6	GII.17	GI.4	(-)

* GII.4 : GII.4 Sydney 2012

表3 市販殻付き生アサリからのウイルス検出状況（3月購入）

海域	個数	ノロウイルス		サポウイルス	解凍液
		G II型	G I型		
K県	40	GII. 6	GI. 7	(-)	(-)

表4 市販生カキおよび殻付き生アサリからのウイルス検出状況（10月～12月購入）

購入月	検体名 海域	加工日	個数	ノロウイルス	
				G II型	G I型
10月	生カキ B-9	2016年10月14日	3	(-)	(-)
			3	(-)	(-)
	アサリ K県	2016年10月16日	26	(-)	(-)
11月	生カキ B-9	2016年11月24日	3	(-)	(-)
			3	(-)	(-)
			2	(-)	(-)
	アサリ K県	2016年11月25日	29	GII. 2	(-)
12月	生カキ B-9	2016年12月16日	3	(-)	(-)
			3	(-)	(-)
			2	GII. 2	(-)
	生カキ A-30	2016年12月16日	4	GII. 3	(-)
			4	GII. 3	(-)
			3	(-)	(-)
	アサリ K県	2016年12月17日	24	GII. 2	GI. 7

表5 秋田県における食中毒事例の詳細（2016年）

依頼年月日	推定原因食品	原因施設	検出ノロウイルス遺伝子型
2016年1月8日	不明（提供した料理）	飲食店	GII. 4 Sydney 2012 GII. 17
2016年1月26日	不明（弁当）	仕出屋	GII. 4 Sydney 2012
2016年2月9日	不明（弁当）	飲食店	GII. 17

表6 集団感染事例において検出された NoV の遺伝子型 (2016 年)

	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	計
GII. 2										1	6	12	19
GII. 4 Sydney 2012		1		2									3
GII. 6						1							1
GII. 17	2		2	2	1								7
GI. 3					1								1
計	2	1	2	4	2	1	0	0	0	1	6	12	31

(株数)

表7 感染症発生動向調査において検出された NoV の遺伝子型 (2016 年)

	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	計
GII. 2											3	10	13
GII. 3	1	1					1				1		4
GII. 4 Sydney 2012	9	4	1	3	1	1			1			2	22
GII. 17	2	1	2		1								6
GI. 2							1		1				2
計	12	6	3	3	2	1	2	0	2	0	4	12	47

(株数)

表8 感染症発生動向調査において検出された SaV の遺伝子型 (2016 年)

	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	計
GI. 1	1												1
GII. 3					1	2				1			4
計	1	0	0	0	1	2	0	0	0	1	0	0	5

(株数)

平成 28 年度厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)
「ウイルスを原因とする食品媒介性疾患の制御に関する研究」
研究協力報告

流入下水からの腸管系病原ウイルス遺伝子の検出

研究協力者	植木 洋	宮城県保健環境センター
	菅原 直子	
研究分担者	野田 衛	国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

腸管系ウイルス性感染症の流行状況を早期に察知し、被害拡大防止や二枚貝の汚染防止に寄与するための手法として、下水処理場へ流入する流入下水中に含まれる病原ウイルスの挙動の把握が注目されている。流入下水中の各種病原ウイルス遺伝子の検出を試みた結果、主要な胃腸炎起因ウイルスであるサポウイルスおよびノロウイルスの遺伝子は通年検出された。特に感染症発生動向調査の感染性胃腸炎患者報告数と流入下水中のノロウイルス濃度の推移は一致がみられ、流行期には患者およびカキから検出された遺伝子型と流入下水から検出された遺伝子型も一致していた。

A. 研究目的

現在、感染症の流行状況の把握と感染拡大防止のための注意喚起等は、感染症発生動向調査の定点医療機関からの患者報告数が根拠となっている。

しかしこの患者報告数は、発症患者の受診後に集計を行うため、報告数が注意報・警報レベルに達し、注意喚起を行う頃には、すでに流行が拡大している。また、感染性胃腸炎は、小児科定点からの患者数報告のみで、成人での流行状況は把握されていない。

一方、下水道処理施設へ流入する流入下水中には、ヒトから排泄されたウイルスなどの病原微生物が直接流れ込むため、

流入下水を継続的に監視することにより、流行の早期探知が可能となり、潜在的な流行についても把握できる。さらに、カキ等の二枚貝のノロウイルス(NoV)等の腸管系ウイルスの主要な汚染源は下水であることから、下水中のウイルスの動態に関するリアルタイムの情報は二枚貝の汚染防止対策にも寄与できる可能性がある。

そこで、流入下水中の病原ウイルスの挙動の把握がそれらによる感染症の被害拡大防止や二枚貝の汚染防止に寄与できるかを検証することを目的として、胃腸炎起因ウイルスの NoV とサポウイルス(SaV)について、real-time PCR 法を用い

で定量的に検出し、季節的なウイルス遺伝子の消長を把握した。さらに、下水中の NoV 遺伝子濃度と感染性胃腸炎の流行期の患者数の推移を比較した。

B. 研究方法

1. 材料

宮城県内の都市部に所在する下水処理場に流入する流入下水を平成 28 年 7 月～平成 28 年 12 月の毎週 1 回採水し、計 25 検体を試料とした。

2. ウイルス遺伝子の検出

1) 流入下水の濃縮

流入下水を混和後 25 または 50mL を測り取りポリエチレングリコールおよび NaCl を終濃度がそれぞれ 0.08g/mL, 0.021g/mL となるように加え、4°C で 1 夜攪拌した後、10,000rpm で 20 分間冷却遠心した。上清をアスピレーターで取り除き、沈渣に滅菌蒸留水を加え、5.0mL のクライオチューブに洗い込み、下水濃縮液とした。

2) ウイルス RNA の抽出と各ウイルス遺伝子の検出

下水濃縮液 140 μ L について QIAGEN viral RNA mini kit を用いてウイルス RNA を抽出した。

逆転写反応および各ウイルス遺伝子の検出は、図 1 に示した方法で行った。

real-time PCR 法による NoV および SaV 遺伝子の検出は、国立感染症研究所より分与された既知濃度の陽性コントロールを用いて検量線を作成し、試料中のコピー数を算出し、下水 1L あたりに換算した。

各ウイルス遺伝子が検出された場合は、それぞれについてダイレクトシーケンス

を行い、MEGA6 でアライメント後、Blast または Norovirus typing tool 用いて遺伝子型を決定した。

(倫理面への配慮)

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

C. 研究結果

1. SaV の検出状況 (図 2)

調査期間中の全検体から検出され、 $3.5 \times 10^3 \sim 3.7 \times 10^6$ copies/L の濃度で推移し、10 月 26 日に最大値となった。検出された SaV の遺伝子群は G I および G II であった。

2. NoV の検出状況 (図 3, 表 1)

SaV 同様、全検体から検出され、G I 群は $0 \sim 1.6 \times 10^5$ copies/L, G II 群は $1.3 \times 10^4 \sim 4.3 \times 10^7$ copies/L で、G I 群と比較し全体的に G II 群が高い濃度で推移した。県内の感染症発生動向調査で感染性胃腸炎の患者報告数が急増した 11 月からは、下水中の G II 群遺伝子濃度が急激に増加し、12 月 7 日採水の検体が最高値を示した。

また、検出された遺伝子型は、G I 群は全期間で多種の遺伝子型が検出され、G II 群は感染性胃腸炎の非流行期である 7 月～10 月は G II.17 を中心に多種類の遺伝子型が、流行期となる 10 月末～12 月は G II.2 のみが検出され、同時期には感染性胃腸炎集団事例の患者や市販生食用カキからも G II.2 が検出されていた。

D. 考察

流入下水中から水中病原ウイルスであ

る、SaV, NoV の定量的な検出を試みた。その結果、胃腸炎ウイルス一つの SaV は、全期間で検出された。また、感染症発生動向調査で胃腸炎患者から検出された SaV と同じ遺伝子型が下水からも検出されたことから、散発的な発生は通年的に起きていることが推測された。

一方、調査期間中には集団感染事例の患者からの SaV の検出はなかったが、10 月下旬に濃度の上昇がみられ、下水処理区域内での小規模な流行などの可能性も考えられた。

NoV の推移については、SaV と同様に全検体より検出され、SaV と比較し高い濃度で推移した。このことは、SaV 同様に NoV による胃腸炎も通年的に発生しており、SaV 感染者よりも NoV 感染者の割合が高いことが考えられた。感染症発生動向調査における患者報告数の少ない時期であっても流入下水から検出されることから、散発的な患者発生に加えて不顕性感染者の存在も示唆された。また、NoV のうち、G I 群および G II 群の汚染量を比較すると、G I 群と比べ G II 群の濃度が高い傾向を示し、G II 群感染者の存在割合が高いことが推察された。

感染性胃腸炎の流行期となった、10 月下旬からは NoV G II 群遺伝子濃度が上昇し、12 月初旬に最大値を示した。この時期、宮城県内ではノロウイルスによる感染性胃腸炎の集団事例が多発し、感染症発生動向調査の定点あたり患者報告数も急増した。これら事例の患者から検出された遺伝子型は G II.2 であり、同時期の下水からも G II.2 が検出された。このことから、流入下水から検出されるウイ

ルス遺伝子が流域での感染性胃腸炎流行状況を直接的に反映していると考えられた。また、患者数推移と流入下水中の NoV G II 群遺伝子の濃度推移を比較すると、流入下水中の遺伝子濃度の上昇がより早期に確認された。(図 4) このことは、流入下水の NoV 遺伝子を継続的に監視することにより、感染性胃腸炎流行の早期探知の可能性が示された。

E. 結論

下水処理施設に流入する流入下水について、水中病原ウイルスの NoV, SaV 遺伝子の検出を試みた。その結果、各ウイルス遺伝子は通年的に検出され、下水から検出された NoV と SaV 遺伝子は、感染性胃腸炎患者から検出された遺伝子型と同じ遺伝子型であった。

また、下水中の NoV 遺伝子濃度は感染性胃腸炎患者報告数の増加よりも、早期に上昇することが確認され、感染性胃腸炎流行の早期探知の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
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

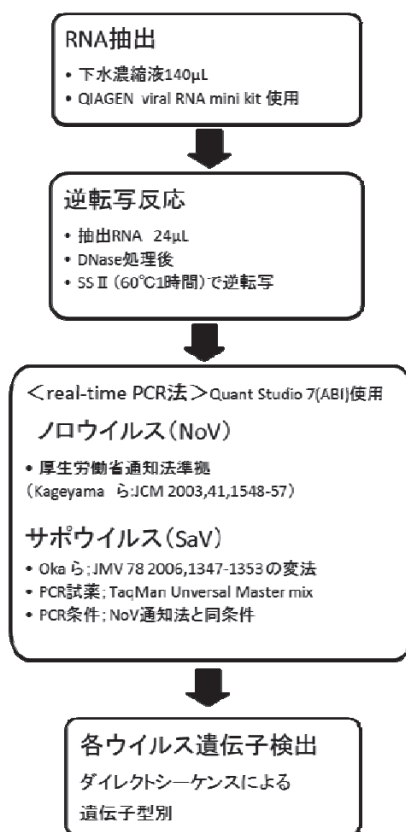


図1 各ウイルス遺伝子の検出方法

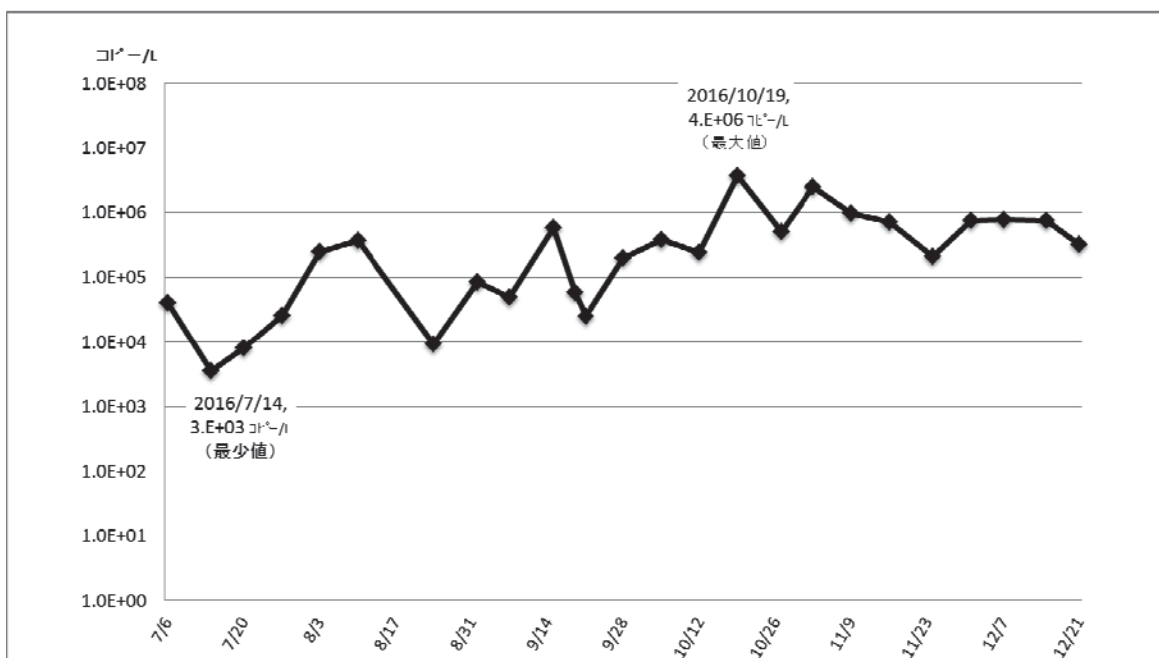


図2 流入下水中のサポウイルス遺伝子の濃度推移

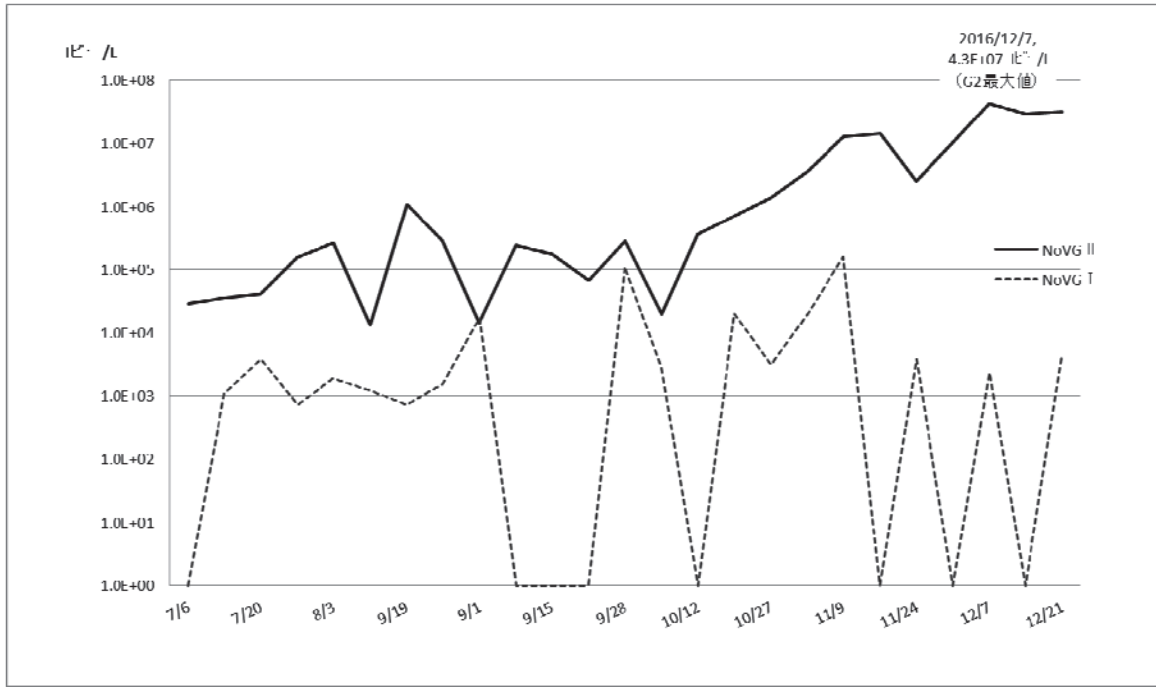


図3 流入下水中のノロウイルス遺伝子濃度推移

表1 検出されたノロウイルスの遺伝子型別 (■は検出された遺伝子型)

<NoVG I 群>		7/6	7/14	7/20	7/27	8/3	8/10	8/19	8/24	9/1	9/7	9/15	9/21	9/28	10/5	10/12	10/19	10/27	11/2	11/9	11/16	11/24	12/1	12/7	12/15	12/21
GI.1		■								■										■						■
GI.2																										
GI.3							■								■		■									
GI.4																										
GI.6								■																		
GI.9																				■						

<NoVG II 群>		7/6	7/14	7/20	7/27	8/3	8/10	8/19	8/24	9/1	9/7	9/15	9/21	9/28	10/5	10/12	10/19	10/27	11/2	11/9	11/16	11/24	12/1	12/7	12/15	12/21
GI.2					■	■													■	■	■	■	■	■	■	■
GI.3										■																
GI.4							Sydney2012																			
GI.5																										
GI.6		■											■	■												
GI.7																										
GI.17		■	■	■					■								■									

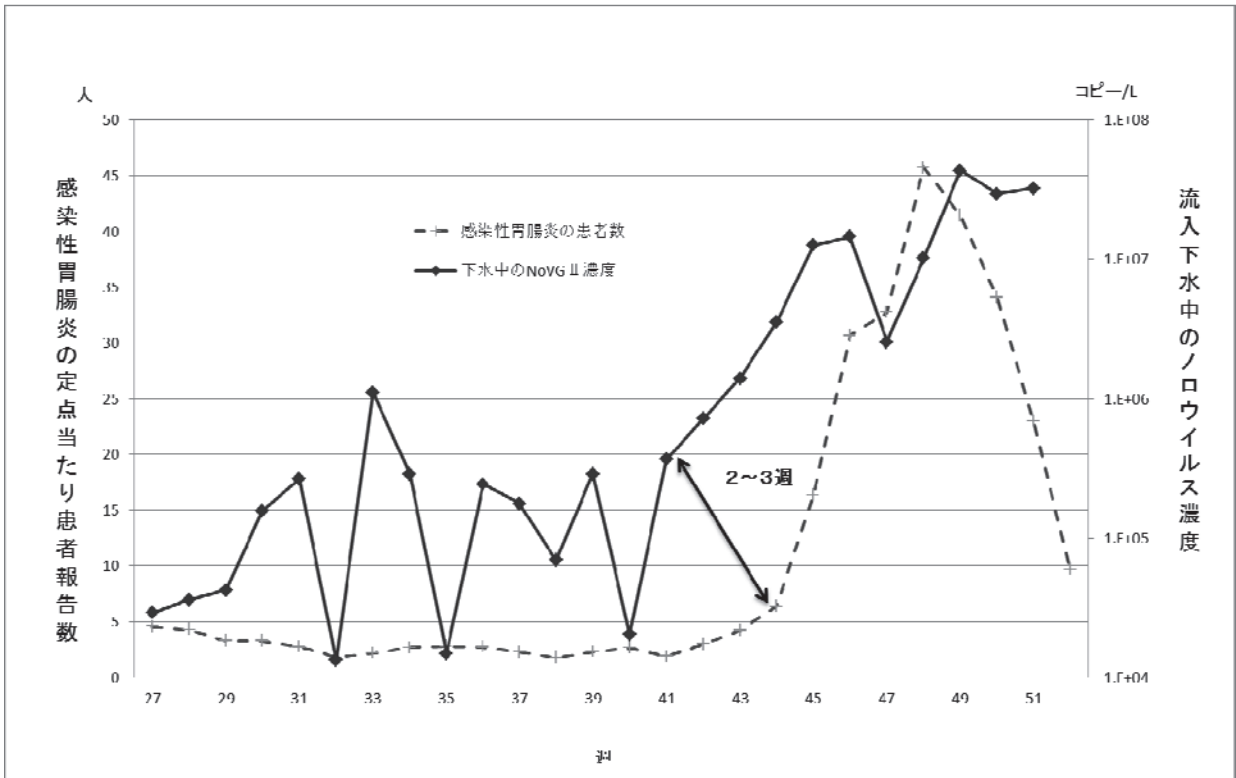


図4 感染性胃腸炎の定点当たり報告数と流入下水中の NoV G II 群濃度推移

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

研究協力者 田村 務 新潟県保健環境科学研究所
研究分担者 野田 衛 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

調理従事者による食品汚染が食中毒の原因となることが多く、手指の衛生管理が重要な課題である。そこで、水溶性高分子ポリマーで手指をコーティングすることで、その後の汚染を簡易に除去できないか検討した。

3%カルボキシメチルセルロースの 45%エタノール液 (CMC 液) や 7%ポリエチレングリコール 85%エタノール液 (PEG 液) により指をコーティングし、簡易な水洗いで、墨汁の汚れを容易に落とすことができた。また、CMC 液のコーティングにより、水流のみでノロウイルスの汚染を 79%低減できた。また、PEG 液のコーティングに加え指をこすることで、ノロウイルスの汚染を 87%洗い流すことができた。

トイレの前に手指をこれらのコーティング剤で保護することで、トイレ後の水洗いにおいて、トイレ中のウイルス汚染を効率的に洗い流すことができると考えられる。

A. 研究目的

食中毒の多くが調理従事者による食品汚染が原因となっている。食品の汚染は手指を介して汚染することが多いと考えられ、厳重な手洗いの方法が周知されたり、多くの手指消毒剤が販売されたりしている。しかし推奨されている手洗い方法は時間や手間を要し、それを日々実践することは容易であるとは言いがたい。

手指をウイルスにより汚染する機会として最も多いのはトイレと考えられ、特に自分のお尻を拭く際に手指を汚すこと

が多いと考えられる。

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

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

B. 研究方法

1. 材料

水溶性ポリマーとして、以下 A, B の二種類を使用した。

A ポリエチレングリコール 6000

85%エタノールに 1, 3, 5, 7, 10%に溶解して使用液 (PEG 液) とした。

B カルボキシメチルセルロース

45%エタノールに 1, 2, 3%に溶解して使用液 (CMC 液) とした。

2. 墨汁の汚染除去効果の検討

PEG 液と CMC 液で、どの希釈濃度で最も墨汁の汚れを落とす効果があるかを評価した。対照として、墨汁のみ (コーティング無し)、および市販の消毒用ハンドジェルを塗布した。

試験方法は、次の手順で実施した。

①水溶性ポリマー液を人差し指、中指、薬指の腹側に 20 μ L 塗布し、ドライヤーで乾燥させた。

②2 倍希釈した墨汁を 2 μ L ポリマーを塗布した指に滴下し、ピペットの腹で 1 往復して伸ばし、ドライヤーで乾燥させた。

③1 分間で 413mL (3 本併せて 1240 mL) 出る定量ポンプの水流で指を 20 秒洗い流した。

定量ポンプは、Geotech Environmental Equipment 社の Geopump を使用した。また、3 本の管から同じ量の水が出るように図 1 のような分岐管を作成した。この時の水温は 14°C であった。

3. ノロウイルスの汚染除去効果の検討

実験 1 で効果が確認された 7%PEG 液と 3%CMC 液について、ノロウイルスによる汚染の除去効果を評価した。

ノロウイルス液: GII.4 型のノロウイルス陽性便を 0.5%BSA (牛血清アルブミン) 加 PBS (-) で溶解し、9000rpm 20 分遠心後の上清を更に 5 倍希釈して -80°C に冷凍保管し、これを使用した。

実験方法は以下のとおり実施した。

①水溶性ポリマー液を指の腹側に 20 μ L 塗布し乾燥させた。

②5 μ L のノロウイルス液を塗布し、乾燥させた。なお、5 μ L 中のノロウイルスのコピー数は、 1.5×10^7 個であった。

③B. 2 ③と同じ定量ポンプの水流で 20 秒間洗い、ペーパータオルで余分な水をふき取った。

汚染が容易に落ちるよう、指をこする動作を入れた実験も行った。

この時の水温は 8°C であった。

④0.1%Tween 加 PBS が 3 mL 入ったアセトニトリル製クリーンルーム用手袋の指をカットした指サック (クリーンファーストニトリル (クリーン洗浄済・ γ 線滅菌済) (アズワン)) をはめて、輪ゴムをかけた。

⑤60 秒指サックをもみ、指を洗った。輪ゴムを外し、指サックを外した。

⑥指サックから洗浄液をそれぞれチューブに回収した。

⑦指を 1000ppm の次亜塩素酸ナトリウム液で 1 分すすぎ、その後ハンドソープで手洗いして、次の実験を繰り返した。

表 1 のとおり条件を変えて、一人の手で 5 回①から⑦を繰り返して実験した。

なお、ノロウイルスで汚染した指を洗い流した水はバットに貯め、次亜塩素酸ナトリウム液で消毒した。

指サックから回収した洗浄液 2ml から、

BSA-PEG 法にてノロウイルスを濃縮した。具体的には、2ml の回収液に、BSA:0.04g、PEG6000 : 0.18g、NaCl : 0.09g を入れて加温溶解し、4°C で一晩静置後、10000rpm で 30 分遠心して約 40 μ L の BSA の沈渣を得た。これに、100 μ L の PBS(-)を加えて溶解し、QIA Viral RNA mini kit (QIAGEN) でウイルス RNA を抽出した。さらに、High-capacity RNA-to-cDNA kit (Thermo-Fisher Scientific) により cDNA を合成し、厚生労働省通知法のリアルタイム PCR 法で GII 型ノロウイルスを定量した。なお、コピー数に換算するため、ノロウイルス標準プラスミドは、国立感染症研究所から分与された物を用いた。(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. 墨汁の汚染除去効果の比較

PEG 液をコーティングした場合は、7% 以上で、墨汁を落とす効果が最大となった (図 2)。CMC 液をコーティングした場合は、3%が最も汚れ落とし効果が高かった (図 3)。

一方、PEG 液や CMC 液でコーティングせず、墨汁を直接指に付けて 20 秒流水で洗っても、墨汁は全く落ちなかった。また、市販の消毒用ハンドジェルを付けても同様に墨汁は落ちなかった。

2. ノロウイルス汚染除去効果の比較

汚染の除去効果の結果を図 4 に示した。

2 本あるいは 3 本の指で同じ条件で実施したデータを算術平均してグラフに示

した。

コーティングせずに、水流のみで指を洗った場合、指から回収できたノロウイルスは 1.9×10^3 コピーであった。

7%PEG 液でコーティングした場合、 1.1×10^3 コピーの回収量であった。この PEG 液でコーティングして、洗浄時に指をこすった場合は、回収量は 2.5×10^2 コピーと、こすらない場合に比べ 1/5 となり、使用しない場合に比べて、87%の低減効果があった。

3%CMC でコーティングした場合は、洗浄後のノロウイルスの回収量は 4.0×10^2 コピーで、使用しない場合の 21%となった。

また、この実験の際の BSA-PEG 法によるノロウイルスの添加回収率は 55%であった。ノロウイルス液を塗布しない指からはノロウイルスは検出されなかった。

D. 考察

排便後の肛門拭き取り時の手指の汚染が手指自体や衣服の袖口を汚染することが実証されている¹⁾。調理従事者が関与する食中毒では、このようなトイレにおいて汚染した手指を介して食品が汚染され食中毒につながると思われる。食中毒や感染予防のために厳重な手洗いの方法が示されているが、実際に日々実践することは容易とは言いがたい。また、ノロウイルス感染症では不顕性感染も多く、感染を認識することが無い場合は、手洗いを簡易に済ませる場合も多いと考えられる。また、多くの手指消毒剤が販売されているものの、それだけの使用では十分な不活化効果は期待できない。

そこで、トイレの後の手指汚染リスク

を減らすため、トイレ前に水溶性高分子ポリマーで手指をコーティングして、トイレ時の汚染を手洗い時に簡易に除去できないか検討した。

水溶性高分子ポリマーとして、PEG6000はノロウイルスの濃縮用に使用されており、ノロウイルスの汚染を捕捉することができると考え、実験に使用した。PEGも化粧品等で多用されており、安全性に問題はないが、調理従事者の用途を考え、手指に残留しても問題無い食品添加物としてCMCも試してみた。

手指に塗った後速やかに乾燥させるため、エタノール水溶液に溶解させた。PEGは85%エタノールに容易に溶解するが、CMCは溶解するために水が必要であることから、45%エタノールに溶解し、最大で3%にしか溶解できなかった。

これらのポリマーを使用してまず墨汁を落とすことができるかどうか試したところ、水流だけでも洗い流すことができ、さらに指をこすると容易に墨汁を除去できた。実際のノロウイルス汚染で試したところ、CMC液を使用した場合は、ノロウイルスによる汚染を「20秒の水流のみ」で使用しない場合に比べて約1/5(21%)に減少できた。また、PEG液によるコーティングでは「20秒の水流+洗浄中に指をこする」ことで、ノロウイルスによる汚染を、使用しない場合に比べて約13%に減少できた。

今回、2種類の水溶性ポリマーによる手指のコーティングで、その後のノロウイルス汚染を水で洗い流すだけで、減らすことが可能であると確認できた。

トイレの前にこれらの水溶性ポリマー

でコーティングすることで、トイレ中のノロウイルスによる手指汚染を容易に水洗いで低減することができ、手洗い補助剤として使用することで食中毒や感染のリスクの低減に活用できると思われる。

今回は、指の腹部分の汚染で、簡易な評価であったが、今後は手全体で、石けんを使用した場合と比較して汚染の低減効果があるかどうか評価が必要である。

E. 結論

PEGやCMCなどの水溶性高分子ポリマー化合物で手指をコーティングすることで、その後の汚染を手洗い時に、水流のみで簡易に低減できると考えられる。

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

文献

1. トイレを起点とするノロウイルス汚染拡大の検証 長野県北信保健福祉事務所 (<http://www.pref.nagano.lg.jp/hokuho/syokuhin-anzen/documents/toirenoro.pdf>)



図1 分岐管
 5本の出口のうち3本を使用。
 出口の口径は3mm

表1

	人差し指	中指	薬指
1回目	PEG液のみ	CMC液のみ	塗布無し
2回目	7% PEG液 +ノロウイルス液	7% PEG液 +ノロウイルス液	7% PEG液 +ノロウイルス液
3回目	3% CMC液 +ノロウイルス液	3% CMC液 +ノロウイルス液	塗布無し
4回目	7% PEG液 +ノロウイルス液 +こすり洗い	7% PEG液 +ノロウイルス液 +こすり洗い	塗布無し
5回目	コーティング無し ノロウイルス液のみ	コーティング無し ノロウイルス液のみ	塗布無し

※こすり洗い：5秒水流で洗う+指をこする+15秒水流で洗う

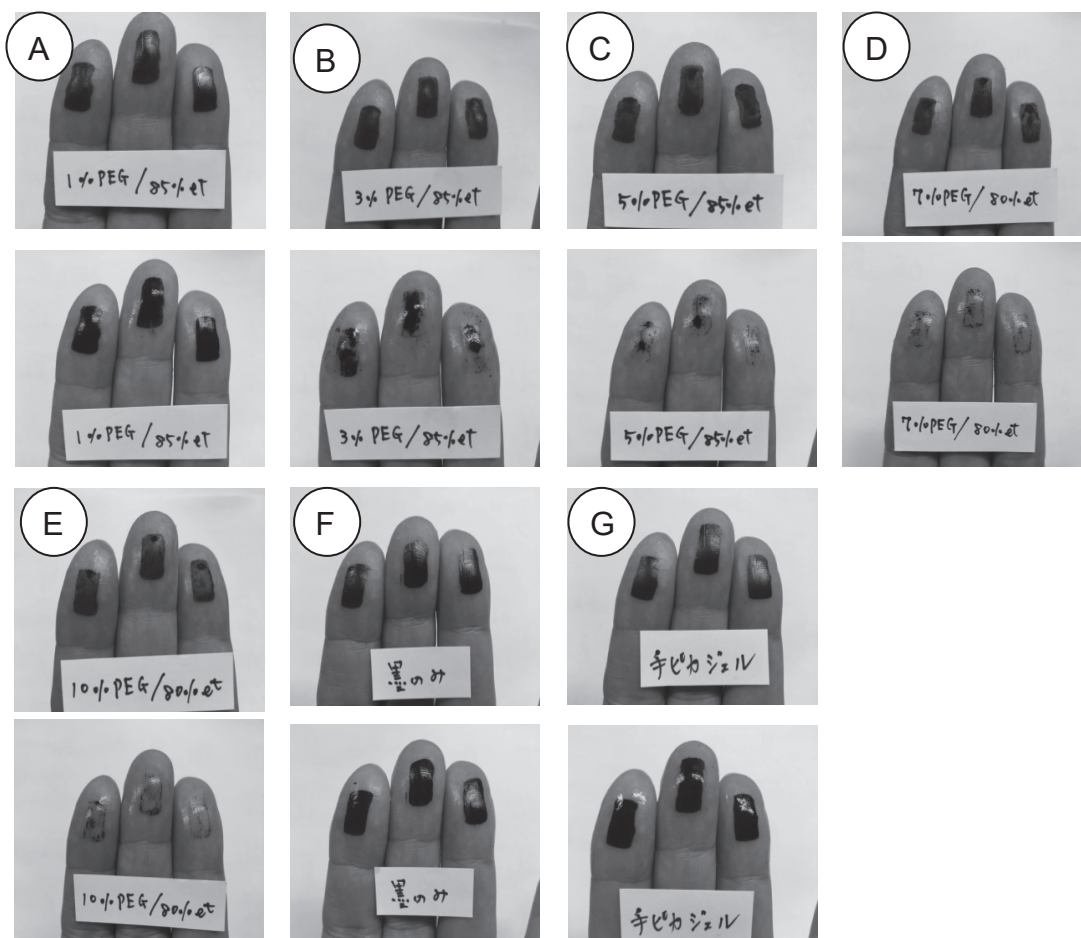


図2 PEG液のコーティングによる墨汁の除去効果

A : 1%PEG、B : 3%PEG、C : 5%PEG、D : 7%PEG、E : 10%PEG、いずれも 85%エタノール液に溶解。 F : コーティング無し、G : 市販の消毒用ハンドジェル。

上段は洗浄前、下段は洗浄後

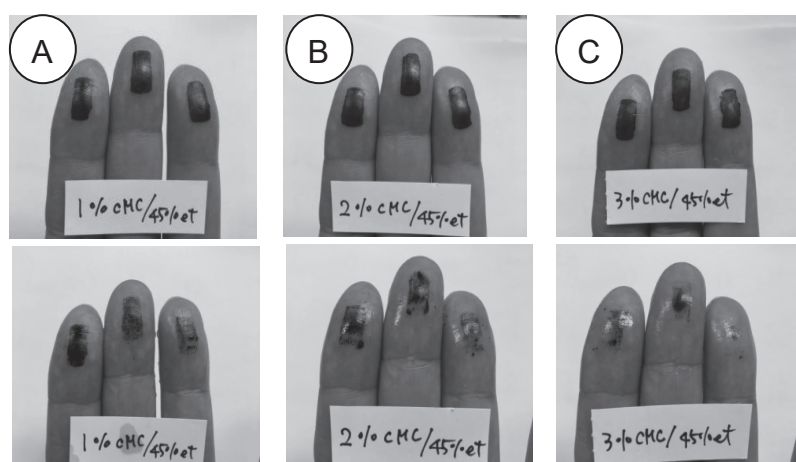


図3 CMC液のコーティングによる墨汁の除去効果

A : 1%CMC、B : 2%CMC、C : 3%CMC、いずれも 45%エタノール液に溶解。

上段は洗浄前、下段は洗浄後

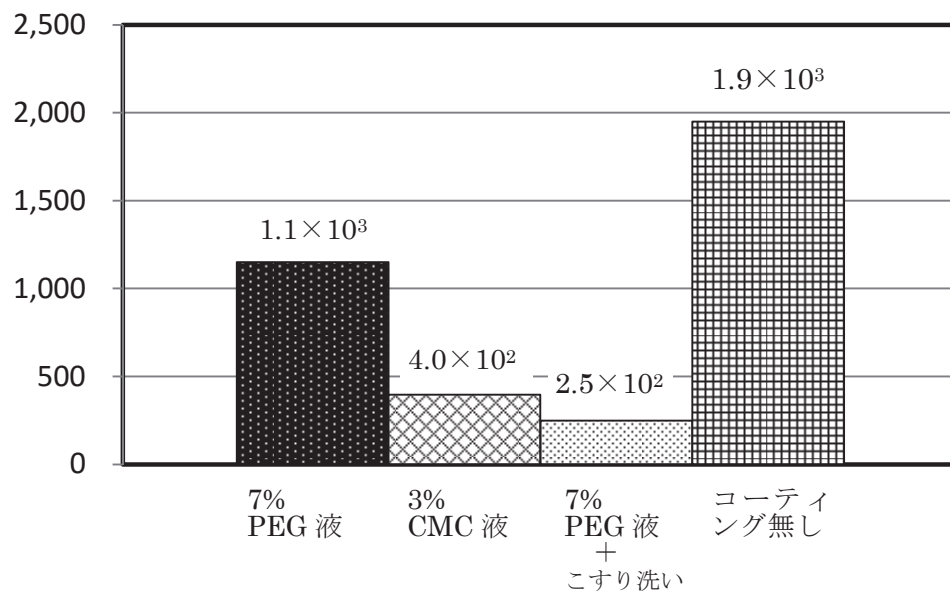


図4 3%CMC液と7%PEG液のコーティングによるノロウイルスの除去効果の比較

平成 28 年度厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)
「ウイルスを原因とする食品媒介性疾患の制御に関する研究」
研究協力報告

東京都におけるノロウイルスを原因とした集団発生例での
遺伝子型の解析 (2013/14～15/16 シーズン)

研究協力者	宗村 佳子	東京都健康安全研究センター
研究協力者	森 功次	東京都健康安全研究センター
研究協力者	永野 美由紀	東京都健康安全研究センター
研究協力者	木本 佳那	東京都健康安全研究センター
研究協力者	小田 真悠子	東京都健康安全研究センター
研究協力者	奥津 雄太	東京都健康安全研究センター
研究協力者	秋場 哲哉	東京都健康安全研究センター
研究分担者	野田 衛	国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

ノロウイルス食中毒予防の基礎資料とするために、2013/14～15/16 シーズンの東京都における集団発生例から検出されたノロウイルスの遺伝子型を解析した。その結果、2013/14 シーズンにおいては GII.4 が 55.1% (108/196) の事例から検出され最多であったが、2014/15 及び 2015/16 シーズンにおいては GII.17 がそれぞれ 33.1% (83/251)、42.6% (83/195) から検出され、最多遺伝子型となった。検出された GII.17 のうち、85 例について全長解析を行なったところ、全て GII.P17-GII.17 であり、85 例中 82 例は系統樹上、Hu/GII.P17-GII.17/Kawasaki308/2015/JP (Kawasaki308 株) と同一のクラスターに属していた。

A. 研究目的

ノロウイルス(NoV)は代表的な胃腸炎感染症原因ウイルスであり、NoV の遺伝子型の把握は、長期的な疫学解析において有用である。今回、NoV 食中毒予防の基礎資料とするために、2013/14～15/16 の過去 3 シーズンに東京都内で検出され

た NoV について、その遺伝子型を解析したので報告する。

B. 研究方法

1. 材料

2013/14～15/16 シーズンに食中毒あるいは施設内感染が疑われ、胃腸炎ウイ

ルス検査の依頼があったもののうち、NoV が陽性となった 672 事例 959 検体（患者糞便等）から抽出した RNA を材料とした。

2. 方法

N/S 領域の塩基配列をダイレクトシーケンスにより決定し、Norovirus Genotyping Tool Version 1.0 により遺伝子型を分類した。また、GII.17 が検出された検体うち 85 例については全長の塩基配列を調べた。

（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

1. 結果

NoV 陽性事例は 2013/14 シーズンは 196、2014/15 シーズンは 251、2015/16 シーズンは 195 事例であった（図 1）。遺伝子型別検出状況を見ると、GII.4 は 2013/14 シーズンには 55.1%（108/196）と半数以上を占めていたが、2014/15、2015/16 シーズンではそれぞれ 21.1%（53/251）、25.1%（49/195）と検出割合が減少した。これに対し、GII.17 は 2013/14 シーズンにはわずか 2 例（1.0%）の検出であったが、次の 2014/15 シーズンには 33.1%（83/251）、さらに 2015/16 シーズンでは 42.6%（83/195）から検出され、この 2 シーズンにおいては最多遺伝子型となった。GII.17 検出例のうち全長解析を行った 85 例は全て GII.P17-GII.17 であり、VP1 の全長による系統樹解析の結果、3 例が

Hu/GII.P17-GII.17/Kawasaki323/2014/JP(Kawasaki323 株)と同一のクラスターに属していたが、82 例は Hu/GII.P17-GII.17/Kawasaki308/2015/JP (Kawasaki308 株) と同一のクラスターに属していた。Kawasaki323 株と同一のクラスターに属していた検体は 2013/14 シーズンに検出された 2 例と 2015 年 8 月に検出された 1 例であった。GII.17 の検出状況を月別に辿ると、2014/15 は、シーズン当初にはわずか 1 例のみしか検出されていなかったが、2015 年 1 月以降に検出例が急増していた。2015/16 シーズンにおいても同様に、9 月から 12 月までは 9 例しか検出されていなかったが、2016 年 1 月以降に検出例が増加し、シーズンを通して 83 例が検出された。GII.17 は、2 シーズン続けて、検出数のピークが 1 月以降と他の遺伝子型と比較して遅いが、シーズンを通して積算すると検出数が最多となった。

D. 考察

2015 年以降、NoV の新規遺伝子型 GII.P17-GII.17 の流行が世界的な話題となり、国内および海外諸国で本遺伝子型の流行が広く報告されている。今回、東京都における過去 3 シーズンの GII.17 の流行状況について解析を試みたが、今回の結果から、東京都においても同様に GII.P17-GII.17 が 2014/15 シーズン以降流行していたことが確認された。Kawasaki308 は、Kawasaki323 よりも時系列進化の観点から新しい株とされ、GII.17 は、Kawasaki323 から、Kawasaki308 の亜株に進化しつつ、

2014/15 から 2015/16 の 2 シーズンにおいて、流行を維持していたと考えられた。2016/17 シーズンにおいても引き続き検出状況を注意深く見守る必要がある。GII.17 の検出が他の遺伝子型 (GII.4) に比し、やや遅れて増加し始める点についてはまだ十分な考察ができていない。今後、様々な角度から検証を試み NoV の流行状況の解明に役立てたい。

E. 結論

2013/14 シーズンにおいて、東京都で最も多く検出された NoV の遺伝子型は GI.4 であった (55.1%) が、14/15 及び 15/16 シーズンにおいては GI.17 がそれぞれ 33.1% (83/251)、42.6% (83/195) から検出され、最多遺伝子型となった。検出された GI.17 のうち、85 例について全長解析を行なった結果、全て GI.P17-GI.17 であり、大多数は Kawasaki308 株と同一のクラスターに

属していた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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)
- 2) 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,38(1):5-6(2017)

2. 学会発表

- 1) 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

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

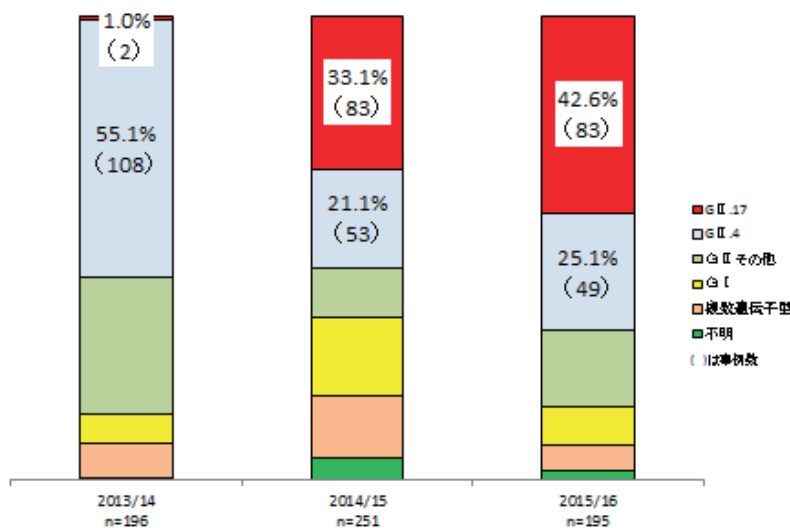


図1 検出されたNoV遺伝子型の割合 (2013/14～15/16シーズン、東京都)

平成 28 年度厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)
「ウイルスを原因とする食品媒介性疾患の制御に関する研究」
研究協力報告

食中毒及び感染症事例で検出されたノロウイルスの分子疫学解析

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

研究要旨

ノロウイルス食中毒予防の基礎資料とするために、2014 年 9 月から 2017 年 1 月の期間に行政検査依頼により搬入された糞便検体から検出されたノロウイルスについて、流行状況を把握し、検出された遺伝子型の推移を調査した。

2014/15 シーズンでは GII. 4 による事例が最も多く 23 事例発生した。次いで GII. 17 (16 事例)、GI. 2 (8 事例) の順で事例数が多かった。2015/16 シーズンには、GII. 17 (14 事例) が流行の主流となり、GII. 4 (11 事例) を上回った。2016/17 シーズンは現在のところ、GII. 2 が 13 事例と、大きな流行により大半を占め、1 事例のみ GII. 17 が発生した。

GII. 4 は数年おきに亜型が出現することが知られているが、検出事例が減少傾向にあることや、Sydney2012 株が未だに検出され続けていること、ここ数年 Capsid N/S 領域におけるアミノ酸配列に変異がみられないことを考えると、近いうちに新たな亜型が出現する可能性もある。また、GII. 17 は変異株の出現によって大きな流行を引き起こしたが、2016/17 シーズンは現在のところ検出事例が少ない。しかしながら、GII. 17 はここ 2 シーズン連続して年明けに事例数のピークを迎える傾向があり、引き続き注視する必要がある。

ノロウイルスはシーズンごとに流行する遺伝子型が異なるため、今後も GII. 4 や GII. 17、GII. 2 など近年流行の主流となっている遺伝子型の発生状況について、注意深く監視することが重要である。

A. 研究目的

ノロウイルスによる食中毒は主に冬季に発生し、全国での食中毒事件事数は全細菌性食中毒と比べると少ないものの、1 事例あたりの患者数が多く、ほぼ毎年ノロウイルスが日本における食中毒の患者

数の最上位を占めている。また、ノロウイルスは冬季の感染性胃腸炎の主要な原因ウイルスであり、小児から高齢者まで幅広い年齢層に感染し、保育園・高齢者福祉施設において集団感染が多くみられる。流行する遺伝子型が年によって変動

するうえ、最近では GII. 17 変異株が新たに検出されている。ノロウイルスによる食中毒はこれらの感染症としての流行を背景として発生することから、本ウイルスの流行状況や遺伝子型を分析することは、予防対策上重要である。そこで今回、2014/15 シーズン、2015/16 シーズン及び 2016/17 シーズン（9 月から 1 月まで）のノロウイルス遺伝子型検出状況を把握し、検出される遺伝子型の特徴について調査した。

B. 研究方法

1. 材料

2014 年 9 月から 2017 年 1 月の期間に、食中毒事例及び保育園等における集団発生事例（感染症事例）でノロウイルス検査の行政依頼を受けて当所に搬入された糞便等を検査材料とした。

なお、後述する C. 研究結果の 2. 及び 3. については、倫理面に配慮し、検査検体の調査研究事業に関する同意を得られた 130 検体 60 事例のみを用いた。

2. ノロウイルスの遺伝子型同定

糞便を PBS(-) で 10% 乳剤としたのち、10,000rpm 10 分間遠心した上清を RNA 抽出用検体とした。QIAamp Viral RNA mini Kit (QIAGEN) を用いて抽出した RNA は、DNase 処理、逆転写反応を行ったのち、Capsid N/S 領域についてコンベンショナル PCR を実施し、陽性であったものについてダイレクトシーケンスを行い、解読した塩基配列を Norovirus Genotyping Tool Version 1.0 (<http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool>) を用いて遺伝子型を同定した。

3. 検出されたノロウイルス (GII) の系統樹解析

2. の方法で解読した塩基配列を、MEGA5 を用いてアミノ酸に置換し、代表株及びデータベースから得られた標準株を使用して、最尤法によって系統樹を作成した。

(倫理面への配慮)

本研究の実施については、当所倫理審査委員会にて承認済みである（28 川健安研第 1411 号）。

C. 研究結果

1. ノロウイルス検出状況

川崎市においてノロウイルス検出事例は、2014 年 9 月から 2017 年 1 月までに 106 事例発生しており、そのうち最も多かったのは GII. 4 による事例であった。次いで GII. 17 による事例が多く、この 2 種類の遺伝子型による事例が半数以上を占めた（図 1）。

シーズン別にみると、2014/15 シーズンでは GII. 4 が 23 事例と最も多く、次いで GII. 17 (16 事例)、GI. 2 (8 事例) の順で多かった。2015/16 シーズンでは GII. 17 (14 事例) が GII. 4 (11 事例) を上回り、次いで GII. 3 (4 事例) が多かった。2016/17 シーズンは、2016 年 9 月から 2017 年 1 月までの 5 ヶ月間のみであるが、GII. 2 が 13 事例と大半を占めており、1 事例のみ GII. 17 が検出された（図 2）。

月別に検出状況を見ると、GII. 4 は 12 月や 1 月に検出事例数のピークがくることが多く、GII. 17 は年明けから事例が増加し、2 月や 3 月にピークを迎えており、GII. 17 が GII. 4 を追うように流行する傾

向が2シーズン連続してみられた(図3)。

2. 食中毒事例と感染症事例の比較

食品を介して発生する食中毒事例と、主にヒト-ヒト感染によって引き起こされる感染症事例について、感染経路の違いによって検出される遺伝子型に特徴がないか、比較を行った(図4)。

食中毒事例では、GII.17(19事例)とGII.4(14事例)の2つの遺伝子型が3分の2を占めており、全体の検出状況と同様の傾向がみられた。一方、保育園や幼稚園、小学校等の低年齢層での集団発生事例では、流行のみられたGII.4及びGII.17だけではなくGII.3等、多様な遺伝子型が検出された。

3. 系統樹解析

検出されたノロウイルスGIIについてアミノ酸の系統樹解析を行った(図5)。塩基配列の異なる株でも、アミノ酸に置換すると100%相同性が一致する株が多かった。GII.17については2014/15シーズン以降に検出された株は全てkawasaki323株またはkawasaki308株と同一クラスターに属した。

D. 考察

2014/15シーズンに最も事例数の多かったGII.4は、2015/16シーズンではGII.17の事例数を下回った。2016/17シーズンでは現在のところ1事例も検出されていないことから、GII.4に対する免疫を多くの人々が獲得したため、流行が抑えられている可能性が考えられる。現在までに検出されている株のCapsid N/S領域をみると、アミノ酸の変異がみられないことから、大きな変異は起こっていない

と考えられるが、GII.4は数年おきに亜型が出現し、大きな流行を引き起こすことが知られており、今後も注視していく必要がある。

2014/15シーズンから流行がみられたGII.17変異株は、Capsid N/S領域のみでも既知のGII.17から大きく変異していることがわかり、このように抗原性を変えたことで人々の免疫を回避し、流行に繋がったことが示唆された。また、2シーズン続けてGII.4の流行が収まった年明け頃からGII.17の事例数が増加していることから、GII.4と何らかの干渉作用が起こっている可能性が考えられるが、原因については解明されておらず、Capsid全長やRNA依存性RNAポリメラーゼ(RdRp)領域等、より詳細な解析が必要である。

感染経路による検出遺伝子型の比較では、食中毒事例においては検出される遺伝子型に偏りがあり、獲得免疫によって感染が抑制されていることが示唆された。一方で、保育園等における集団発生事例では、多様な遺伝子型が検出された。低年齢層においては獲得免疫が不十分であるため、流行遺伝子型に関わらず感染し、集団の中で蔓延したことが推測される。

2016/17シーズンでは、GII.2の大きな流行があり、川崎市においてはGII.4は検出されておらず、GII.17も1事例のみとなっている。GII.17については2シーズンと同様に、2月に事例数が増加する可能性もあるため、今後の動向を注意深く監視することが重要である。

E. 結論

2014年9月から2017年1月にかけて川

崎市におけるノロウイルスの流行状況を調査したところ、GII. 4、GII. 17 及びGII. 2 が近年の主流となっていることがわかった。

GII. 4 は数年おきに亜型が出現することが知られているが、近年大きな変異はみられていない。また、GII. 17 変異株は年明けから検出事例数のピークを迎える傾向がみられ、今シーズンも同様にこれから増加する可能性があるため、今後も流行状況を注視していくことが重要である。

F. 研究発表

1. 論文発表：なし
2. 学会発表：なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

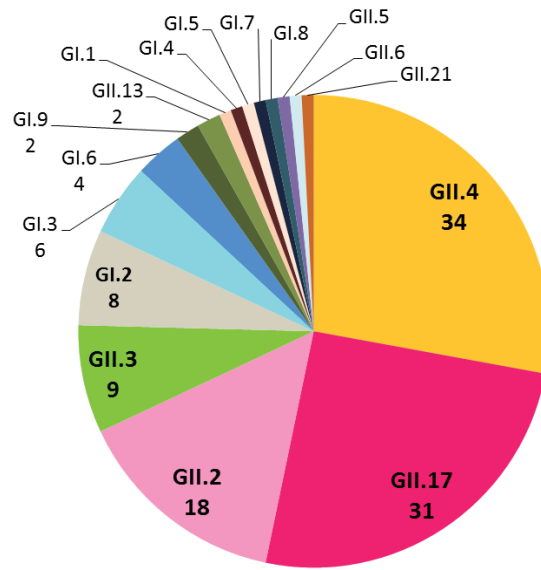


図1 検出遺伝子型別事例数 (2014.9~2017.1)

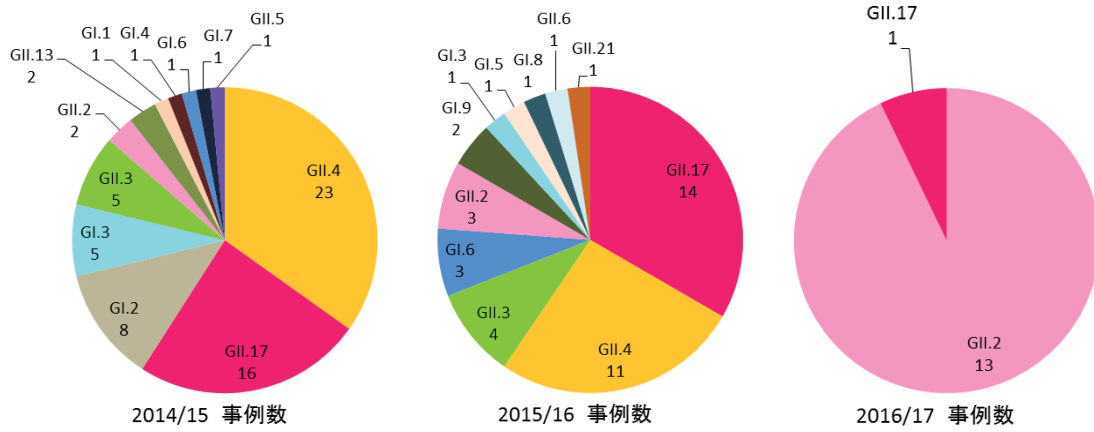


図2 シーズン別検出遺伝子型別事例数

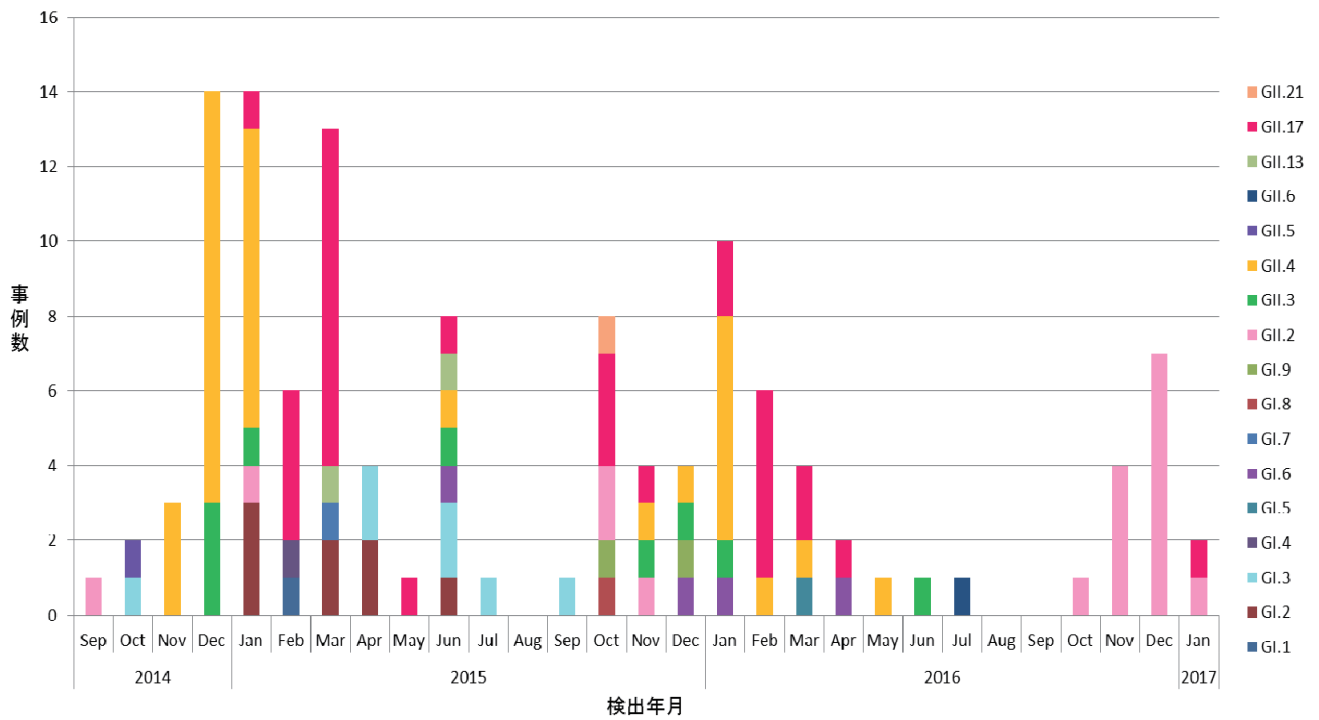


図3 月別検出遺伝子型別事例数

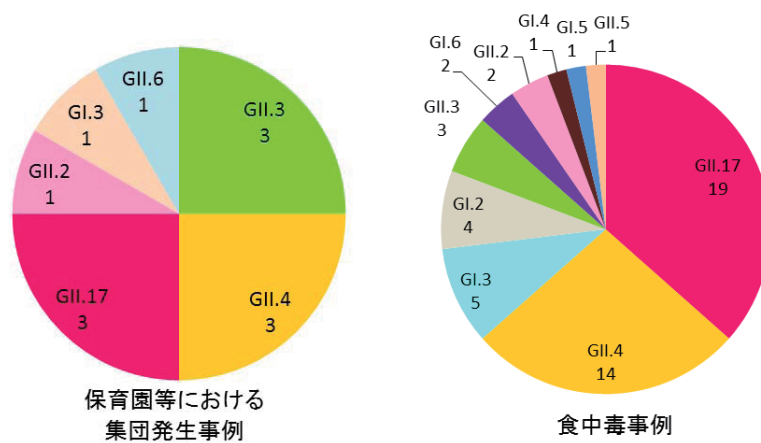


図4 感染経路別遺伝子型別事例数 (2014.9~2017.1)

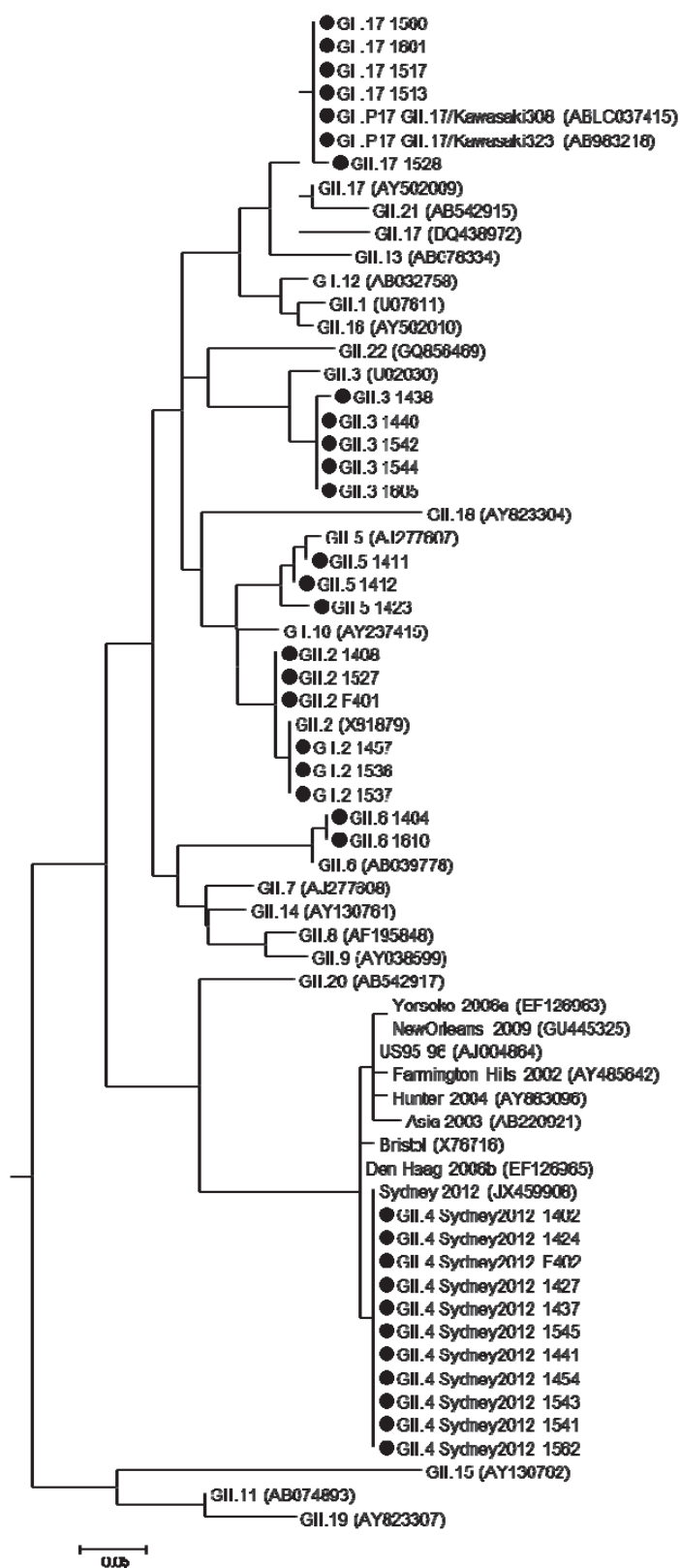


図5 ノロウイルス GII Capsid N/S 領域 (アミノ酸) の系統樹

平成 28 年度厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)
「ウイルスを原因とする食品媒介性疾患の制御に関する研究」
研究協力報告

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

研究協力者	入谷 展弘	大阪市立環境科学研究所
研究協力者	改田 厚	大阪市立環境科学研究所
研究協力者	阿部 仁一郎	大阪市立環境科学研究所
研究協力者	上林 大起	大阪市立環境科学研究所
研究協力者	山元 誠司	大阪市立環境科学研究所
研究協力者	久保 英幸	大阪市立環境科学研究所
研究分担者	野田 衛	国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

調理従事者からノロウイルス (NoV) が検出された食中毒を対象に、調理従事者と患者に由来する NoV の遺伝子解析を実施したところ、すべての事例において両者由来 NoV の遺伝子型、塩基配列が一致した。特に食中毒か否かの判断が困難な NoV 集団事例において、調理従事者由来 NoV の遺伝子解析はその判断を行う際の科学的根拠として有用であった。

大阪市で発生した 2 事例の集団胃腸炎事例から、これまで報告のないキメラウイルス GII. P16-GII. 4 Sydney_2012 が確認された。今のところ、その発生は 2 事例のみであり、胃腸炎発生数に影響していないものと考えられた。また、2016 年 11 月および 12 月に大阪市内の保育園や小学校において NoV GII. 2 事例が多発した。

2016 年 12 月に購入した市販の生食用カキに NoV 汚染 (33. 3%) が認められ、その遺伝子型は同時期にヒトで全国的な流行が認められた GII. 2 であった。

A. 研究目的

ノロウイルス (NoV) 食中毒の中で、調理従事者から食品等への二次汚染が原因であることは多い。今回、感染経路究明における調理従事者由来ウイルス遺伝子解析の有用性について検討した。

また、ヒトの NoV 流行状況や食品中の NoV 汚染状況を把握することは NoV による胃腸炎の流行予測や食中毒や集団感染の予防対策に重要である。本研究では NoV 流行を把握し、新たな変異ウイルスの出現を監視するために、集団胃腸炎事例の

患者糞便および市販生食用カキについて NoV の検索および遺伝子型別を行った。

B. 研究方法

1. 材料

1) 調理従事者由来 NoV の遺伝子解析

患者便および原因施設調理従事者から NoV が検出された食中毒 16 事例を対象とした。

2) 胃腸炎事例から検出された NoV の分子疫学的解析

2016 年 1 月および 3 月に発生した集団胃腸炎 2 事例から検出された NoV GII.4 株 (OH16002、OC16023)、および 2016 年 4 ~12 月に当研究所へ検査依頼のあった集団胃腸炎 132 事例を対象とした。

3) 生食用カキの NoV 汚染調査

2016 年 12 月に市販されていた 3 ロットを NoV の検索に用いた。3 ロットはそれぞれ異なる県・海域から採取されたものであった。

2. 患者糞便材料からの NoV 検出

ウイルス RNA は、10~20%糞便乳剤から QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) を用いて抽出した。cDNA は Random hexamer (Amersham) および逆転写酵素 AMV XL (Life Science) を用いて合成した。NoV の検出は、Kageyama ら (JCM 41, 1548-57, 2003) のリアルタイム RT-PCR 法に従って行った。

3. カキからの NoV 検出

生カキは 1 ロットにつき、カキ 3 個を

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

ウイルス RNA は、High Pure Viral RNA kit (Roche) を用いて抽出した。DNase 処理は、DNase I recombinant, RNase Free (Roche) を用いて、RNA 抽出時にカラム上で行った。cDNA は、High-Capacity cDNA RT Kit with RNase Inhibitor (Life Technologies) および Random hexamer を用いて合成した。NoV の検出は糞便と同じ方法で行った。

4. NoV の遺伝子型別

NoV 陽性検体は Capsid N/S 領域遺伝子を増幅し、塩基配列を決定した。2016 年 1 月および 3 月に発生した 2 事例から検出された NoV GII.4 株は RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) 領域を増幅し (JCM 46, 2406-9, 2008)、塩基配列を決定した。遺伝子型別は、Norovirus Genotyping Tool ver. 1.0 (<http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool#/>) を用いて行った。

(倫理面への配慮)

本研究では、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. 調理従事者由来 NoV の遺伝子解析

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

2. GII.4 株の遺伝子解析

Capsid N/S 領域で Norovirus Genotyping Tool による GII.4 亜型の分類を行ったところ、OH16002 株は GII.4 亜型不明、OC16023 株は GII.4 Sydney_2012 であった。近隣接合法による分子系統樹解析では 2 株ともこれまで報告されていた Sydney_2012 とは少し異なる遺伝的グループを形成した (図 1)。RdRp 領域は 2 株ともに GII.P16 に分類された (図 2)。両株の塩基配列を比較したところ、互いに非常に近縁であった (塩基配列相同性 RdRp 領域 720 塩基において 98.9%、Capsid N/S 領域 282 塩基において 98.9%)。

3. NoV 胃腸炎事例の発生状況

113 事例 (85.6%) から NoV が検出され、ヒトからヒトへ感染が拡がった事例 (PP 事例) は 92 事例、食中毒疑事例は 21 事例であった。PP 事例のうち、77 事例 (83.7%) が 11 月および 12 月に集中して発生していた (図 3A)。主な原因施設は保育園 (75.0%、69/92 事例) および小学校 (22.8%、21/92 事例) であった。食中毒疑事例は 12 月にもっとも多く発生してい

た (10 事例) (図 3B)。カキの喫食が関連していたのは 12 月に発生した 1 事例のみであった。

胃腸炎事例から検出された NoV の中で遺伝子型別できたものは、8 種類 (GI : 2 種類、GII : 6 種類) であった。最も多く検出されたのは 79 事例 (69.9%) から検出された GII.2 であり、次いで GII.6 (10 事例、8.8%) であった。

NoV GII.2 が検出された事例は 10~12 月に発生し、11 月および 12 月に集中していた (図 3A, 3B)。GII.2 事例の中で、PP 事例が 71 事例 (89.9%) であり、ほとんどが保育園と小学校での発生であった。

NoV GII.4 が検出された事例は 7 事例と少なかった。GII.4 の亜型はすべて Sydney_2012 であった。

4. 生食用カキの NoV 汚染状況

1 ロットから NoV GII.2 が検出され、中腸腺 1g あたりの NoV 汚染量 (NoV RNA コピー数) は 31 コピーであった。

D. 考察

病原体や感染経路の特定は、食中毒の判断を行う上で非常に重要な根拠となる。また、調理従事者からの汚染が原因として疑われる場合、調理従事者と患者から検出された病原体の遺伝子型等が一致することは有力な判断材料になる。今回、解析した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。特に事例番号 15 (表) については、患者グループ内に喫食時に

胃腸炎症状を呈していたヒトが存在したため判断が困難であった事例であり、実際に調理従事者由来 NoV の遺伝子解析結果が有力な判断材料になった。しかし、患者等からの検出検査を実施している中で、遺伝子解析を並行して行うことには作業場所、人員、コンタミネーション、コスト等の多くの課題があるため容易ではない。事例ごとに状況を考慮して遺伝子解析実施を判断する必要があると考えられた。

近年では NoV の遺伝子型の一つである GII.4 が主に流行しており、GII.4 の新しい亜型の出現が周期的な大流行をもたらしている。最近の GII.4 亜型出現は 2012 年の Sydney_2012 である。現在、GII.4 Sydney_2012 には 2 種類 (GII.Pe および GII.P4) の RdRp 領域遺伝子型が確認されている。今回、2 事例から確認された NoV GII.P16-GII.4 Sydney_2012 はこれまで報告例がなく、GenBank においても同キメラウイルス遺伝子の登録を確認することができなかった。また、GII.P16 には多様な Capsid 領域の遺伝子型との組み合わせがあり、GII.4 では NoV GII.P16-GII.4 NewOrleans_2009 が GenBank に登録されている。NoV 事例の発生状況と検出された NoV の遺伝子解析結果から、本キメラウイルスは子どもから成人までの幅広い年齢層に感染を起こしていたが、今のところ 2 事例からの検出のみであり、胃腸炎の発生数に影響していないと考えられた。GII.4 亜型の主流である Sydney_2012 は出現から約 5 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。

2016-2017 シーズンは大阪府の感染性胃腸炎の定点あたり患者報告数が第 50 週でピーク (21.2) になり、大阪府では 10 年ぶりに警報レベル開始基準値 20 を超え、過去 10 年間で最も多くなった。大阪市内での集団事例の発生状況も同様に 11 月と 12 月に集中しており、主に NoV GII.2 が検出された。集団事例の発生施設のほとんどが保育園や小学校であったことから、NoV GII.2 は主に低年齢層においてヒトからヒトへ直接感染が拡大したものと推測された。他の地域においても同様の状況が報告 (IASR 2017, vol. 38, 17-20) されており、NoV GII.2 は全国的に流行していたと考えられた。NoV GII.2 の流行原因については今のところ不明であり、今後遺伝子変異等の要因について詳細に解析する予定である。

NoV 食中毒の原因食品のひとつである生カキ中の NoV 汚染状況を監視することは NoV 感染リスクを評価する上で重要であり、ヒトにおける NoV 流行予測にもつながる可能性がある。今回は 1 つの県・海域で採取された生食用カキから NoV GII.2 が検出された。全国的に同時期に NoV GII.2 が流行していた時期でもあり、ヒトで流行していた NoV が反映されたものと考えられた。

E. 結論

1. 判断困難な NoV 食中毒において、調理従事者由来 NoV の遺伝子解析は非常に有用であった。

2. 大阪市で発生した2事例の集団胃腸炎事例から、これまで報告のないキメラウイルス GII.P16-GII.4 Sydney_2012 が確認された。

3. 2016年11月および12月に大阪市内の保育園や小学校において NoV GII.2 事例が多発した。

4. 12月市販の生食用カキに NoV 汚染(33.3%)が認められ、その遺伝子型は同時期にヒトで全国的な流行が認められた GII.2 であった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 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)

2) 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)

3) 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)

2. 学会発表

1) 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)

2) 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)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得: なし
2. 実用新案登録: なし
3. その他: なし

表 調理従事者および患者から検出された NoV 遺伝子の比較

事例 番号	年	発生 場所	推定 原因	患者 数	患者			調理従事者			
					検査 数	陽性 数	遺伝子型	検査 数	陽性 数	患者由来NoVとの比較*	
										遺伝子型	塩基配列
1	2014	飲食店	不明	7	7	6	GII.6	2	1	○	○
2	2014	飲食店	食品	4	3	3	GII.6	3	3	○	○
3	2014	飲食店	食品	30	7	5	GII.4	7	4	○	○
4	2015	飲食店	食品	18	18	10	GII.17	3	2	○	○
5	2015	飲食店	食品	30	11	10	GII.17	2	1	○	○
6	2015	飲食店	食品	35	29	19	GII.17	3	2	○	○
7	2015	結婚式	不明	27	2	1	GII.4	9	1	○	○
8	2015	飲食店	食品	9	5	5	GII.4	2	1	○	○
9	2016	飲食店	食品	9	6	6	GII.17	4	1	○	○
10	2016	飲食店	食品	8	1	1	GII.4	5	2	○	○
11	2016	ホテル	食品	23	9	7	GII.4	4	1	○	○
12	2016	飲食店	食品	10	4	3	GII.17	4	2	○	○
13	2016	飲食店	食品	19	2	1	GII.7	10	1	○	○
14	2016	飲食店	食品	21	7	6	GII.17	2	1	○	○
15	2016	飲食店	食品	29	13	10	GII.6	4	1	○	○
16	2016	飲食店	食品	10	9	5	GII.2	3	1	○	○

* ○: 患者由来株と同一

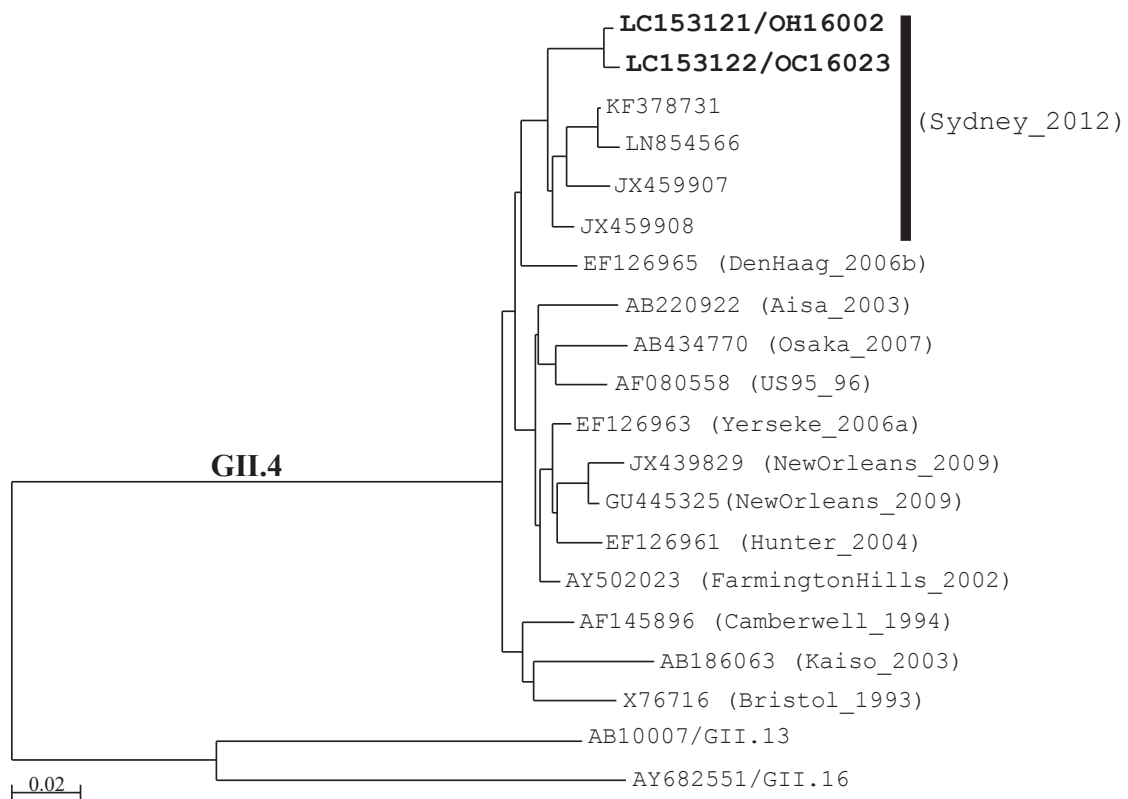


図1 NoV Capsid N/S 領域 (282 塩基) における分子系統樹

分子系統樹は近隣接合 (neighbor-joining) 法で作成した。

太字： 大阪市で検出された GII.P16-GII.4 Sydney_2012 株

他： NoV 参考株

()： GII.4 亜型

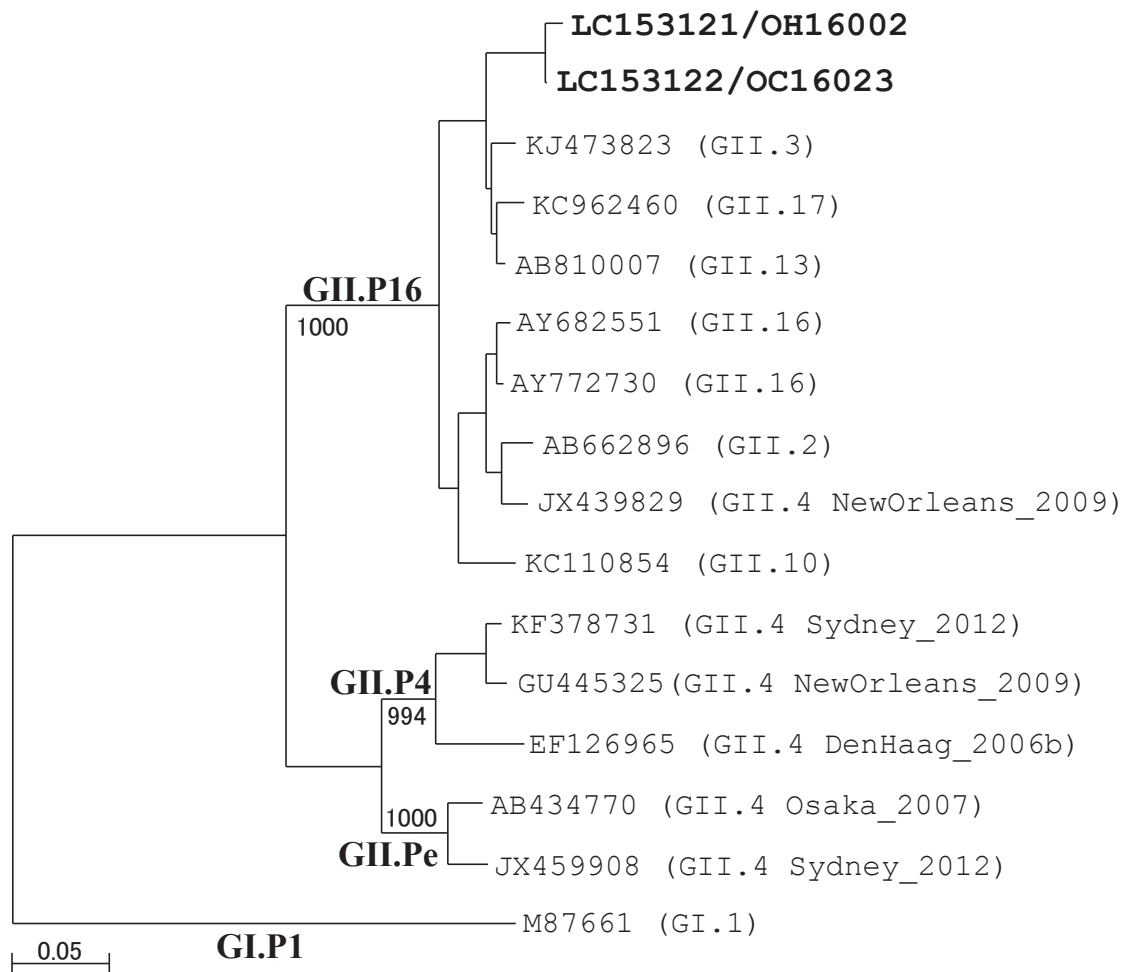


図2 NoV RdRp 領域 (720 塩基) における分子系統樹

分子系統樹は近隣接合 (neighbor-joining) 法で作成した。ブートストラップ値は遺伝的グループを支持する枝にそれぞれ示した。

太字： 大阪府で検出された GII.P16-GII.4 Sydney_2012 株

他： NoV 参考株

()： Capsid 領域における遺伝子型

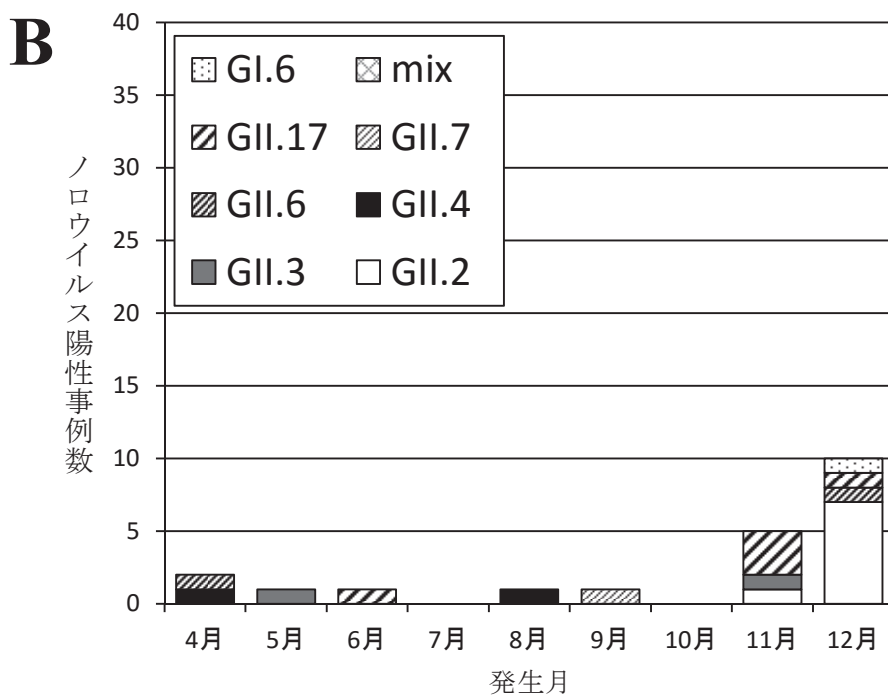
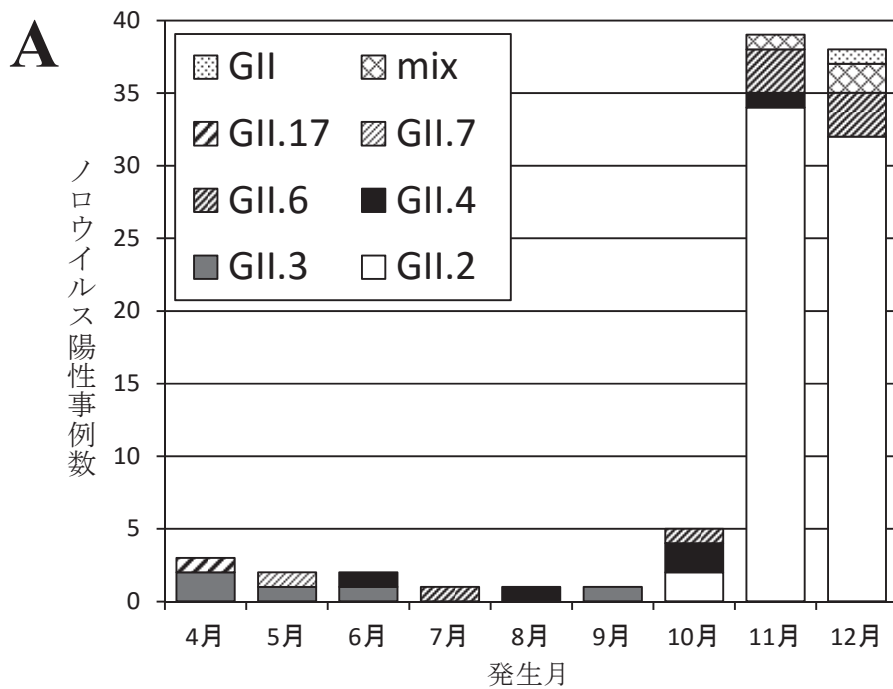


図3 大阪市におけるNoV事例発生状況（2016年）

A, ヒトからヒトへの感染疑事例

B, 食中毒疑事例

mix: 複数の遺伝子型が検出された事例

平成 28 年度厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)
「ウイルスを原因とする食品媒介性疾患の制御に関する研究」
研究協力報告

堺市における下水サンプルを用いた ノロウイルス等の腸管感染ウイルスの流行解析

研究協力者	三好 龍也	堺市衛生研究所
研究協力者	内野 清子	堺市衛生研究所
研究協力者	中谷 誠宏	堺市衛生研究所
研究協力者	岡山 文香	堺市衛生研究所
研究協力者	吉田 永祥	堺市衛生研究所
研究協力者	小林 和夫	堺市衛生研究所
研究分担者	野田 衛	国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

ノロウイルスをはじめとする腸管感染ウイルスの予防対策や下水の二枚貝の汚染防止対策の基礎的データを得ることを目的として、堺市内の下水サンプルを用いて腸管感染ウイルスの遺伝子検出を行い、臨床サンプルからの結果と合わせて分子疫学的解析を行った。

感染性胃腸炎患者の報告数がピークと同時期に、下水中の NoV 遺伝子量もピークとなり、また報告数が多いほど定量値も大きくなった。臨床サンプルと下水サンプルから検出される遺伝子型に相関がみられ、下水中の NoV 遺伝子を調査することにより、NoV 感染症の流行状況を解析することができると考えられる。サポウイルス等の臨床サンプルから検出の少ない下痢症ウイルスについても下水サンプルからは高頻度に検出され、不顕性感染等の存在が示唆された。

A 型肝炎患者の報告はなかったが、A 型肝炎ウイルスが 3 か所から検出された。遺伝子解析の結果から少なくとも 2 系統の HAV の流行があったと考えられた。

下水サンプルを用いた流行解析は、流入地域におけるウイルス感染の包括的把握が可能と考えられる。さらに感染源や経路を解明する上で有用な情報を提供すると考えられる。

A. 研究目的

下水はカキ等の二枚貝の主要な汚染源となっている。また、下水にはヒトから

排泄された腸管系ウイルスが含まれることから、下水の継続的監視は、流行状況の把握のみならず、流行予測や二枚貝の

汚染防止対策への寄与も期待できる。本研究は、ノロウイルス (NoV) の流行状況を感染性胃腸炎の散発・集団発生事例から得られた患者便等の臨床サンプルと下水処理場の流入水及び放流水の環境サンプルの両面から解析し、堺市における NoV 感染症の流行の全体像を把握、解析することにより、NoV 食中毒予防対策に寄与すること目的とする。

加えて、患者発生の頻度は低いが生食中毒の起因ウイルスとなり得る NoV 以外の腸管感染ウイルスの検出も実施し、流行状況を把握する。

B. 研究方法

1. 材料

環境サンプルとして、2014 年 1 月から 2016 年 12 月までに堺市内の 3 つの下水処理場で毎月 1 回採水された流入水 108 検体及び放流水 108 検体、計 216 検体を調査対象とした。臨床サンプルとして、同期間に発生した食中毒及び集団感染事例 8 事例、散発事例 (感染症発生動向調査における感染性胃腸炎患者等) 43 例から得られた糞便を調査対象とした。

2. 下水サンプルの濃縮法

これまでの報告書に準じて行った。すなわち、流入水及び放流水を遠心後 (3,400xg 30min、13,000xg 45min)、上清 1,000ml を分取し、最終濃度 0.05M の MgCl₂ を添加後、HCl で pH3.5 に調整した。調整済み液を HA フィルター (0.45 μm) でろ過し、ウイルスをフィルターに吸着させた。フィルターを細断し、pH10.5 グリシン buffer (流入水 : 5.0ml、放流水 : 2.0ml) で溶出後、HCl で pH6.5 に再調整

し、11,000xg 20min 遠心した上清を RNA 抽出用のサンプルとした。

3. ウイルス遺伝子検出法

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

下水サンプル (流入水) については、濃縮処理後、臨床サンプルと同様にウイルス遺伝子検出を行った。下痢症ウイルスについては、TA クローニングを行い、塩基配列を決定した。遺伝子型は系統樹解析により判定した。NoV の遺伝子型番号は、Norovirus Genotyping Tool Version 1.0 (http://www.rivm.nl/mpf/norovirus_typingtool) に従った。また、流入水及び放流水を用いて NoV リアルタイム PCR を実施し、採取水 1ml 当たりのコピー数を算出した。

(倫理面への配慮)

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

C. 研究結果

1. NoV 遺伝子検出結果

2016 年は、臨床サンプルから GI で 1 種類 (GI.2)、GII で 4 種類 (GII.1, 2, 3, 4) 計 5 遺伝子型の NoV が検出された。2016

年 12 月には、過去 2 年間検出されていなかった GII.2 型が散発例から高頻度に検出された (図 1)。

下水サンプルでは、GI で 4 種類 (GI.1, 2, 4, 6)、GII で 5 種類 (GII.3, 4, 13, 17, 21) 計 9 遺伝子型が検出された。GI.2, GII.4, GII.17 型が多く検出された (表 1)。

2. 下水中の NoV 遺伝子定量測定結果

下水中の NoV 遺伝子量は、小児の感染性胃腸炎が増加する 10 月から増加し、翌年の 7、8 月に減少する傾向がみられた。

(図 2)。感染症発生動向調査による感染性胃腸炎患者の報告数のピーク値が大きいほど、下水中の NoV 遺伝子量 (GII) が多くなる傾向がみられた (図 3)。

3. NoV 以外のウイルス遺伝子検出結果

SaV については、下水サンプルでは、2016 年は年間を通じてほとんどの月で検出され (GI.1, 2, 3, GII.1, 2, 3)、GI.1, 2, GII.3 型が多く検出された (表 2)。GI.3 型については、過去 2 年間検出がなかったが、臨床サンプルから 5 月に、下水サンプルからは 6 月に検出された (表 2)。

AsV、AiV については、2016 年は臨床サンプルからは検出されなかったが、下水サンプルでは、年間を通じてほとんどの月で検出された (表 2)。

HAV については、2016 年は臨床サンプルからは検出されなかったが、6 月の B 下水処理場の下水サンプル及び 2、5 月の C 下水処理場の下水サンプルから検出され (表 2)、遺伝子型はすべて IIIA 型であった (図 4)。

D. 考察

感染症発生動向調査による感染性胃腸炎患者の報告数がピークとなる 10 月～翌年 2 月にかけて、下水中の NoV 遺伝子量もピークとなり、また報告数が多いほど定量値も大きくなった。臨床サンプルから検出される遺伝子型は、下水サンプルから高頻度に検出された。これらのことから、下水中の NoV 遺伝子を調査することにより、NoV 感染症の流行状況を解析することができると考えられる。

SaV、AsV、AiV については、臨床サンプルからの検出は少数であったが、下水サンプルからは年間を通して高頻度で検出された。この理由として、今回の調査における臨床サンプルは、主に小児の感染性胃腸炎や食中毒のサンプルであり、これらのウイルスについては、臨床症状が NoV に比べて軽症又は不顕性感染が多い、小児以外の成人での感染の可能性などが考えられた。

HAV については、B 及び C 下水処理場の流入水から HAV 遺伝子が検出された。同時期に当該下処理場の地域では患者発生の報告はなかったが、この地域に HAV 感染者が存在していたと推測された。C 下水処理場から検出された HAV は、2013 年 12 月に C 処理場、2014 年 3 月に B 処理場から検出されたウイルスと近縁であったが、B 下水処理場から検出された HAV はそれらと異なった系統であった。この時期に少なくとも 2 系統の HAV の流行があったと考えられた。

A 型肝炎については、日本国内で平成 28 年では 269 例 (日本国外での感染を含む) の報告があるが (感染症発生動向調査週報 (IDWR) 速報データ)、潜伏期間が約 1

カ月と長期であるため。疫学調査において感染源の特定が一般的に困難な事例が多い。また、不顕性感染も多いため、感染実態の把握をすることも難しい。下水中の HAV 遺伝子を解析することにより、流入地域における不顕性感染を含めたウイルスの浸淫状況を把握することが可能と考えられた。また、下水から HAV が検出されたことから、カキ等の二枚貝が HAV の汚染を受けるリスクがあることが示された。

下水中のウイルス遺伝子検出では、感染者の症状等の情報が得られないため病原性を解析することはできないが、広域的な感染状況は把握するためには有効な手段である。これらのデータを腸管感染ウイルス、特に NoV の流行予測や食中毒や感染症の予防対策にどのように役立てていくかが今後の課題である。

E. 結論

下水サンプルを用いて腸管感染ウイルスの検出を行った。これらの結果より流入地域におけるこれらのウイルスの浸淫状況の包括的把握が可能と考えられる。さらに感染源や経路を解明する上で有用な情報を提供すると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

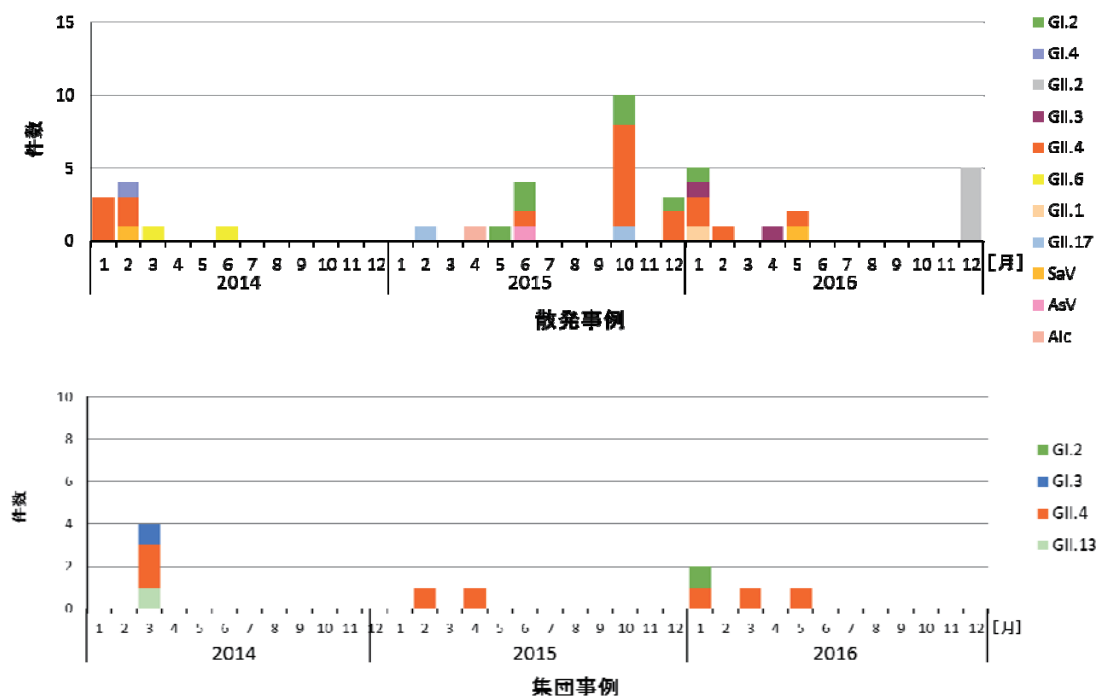
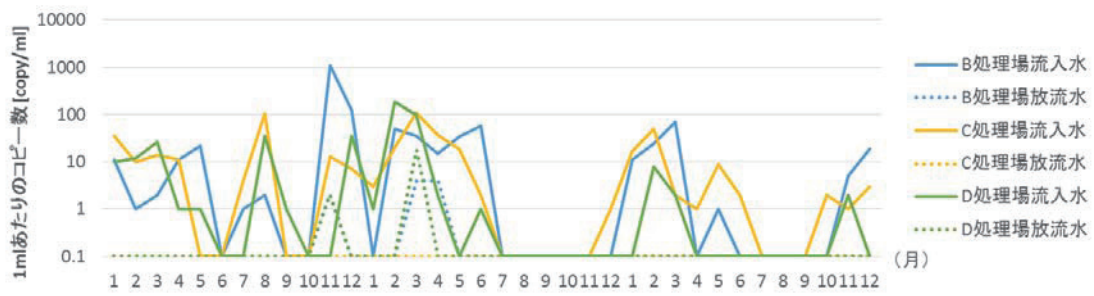
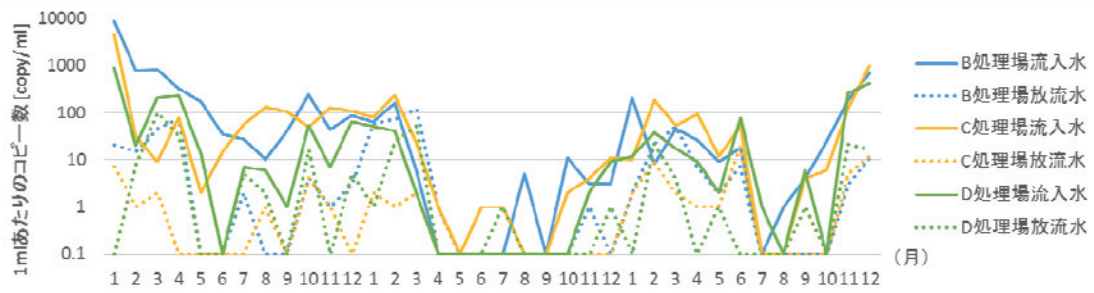


図 1 臨床検体からの下痢症ウイルス検出状況



NoV GI リアルタイム PCR 測定結果



NoV GII リアルタイム PCR 測定結果

図 2 下水中の NoV 遺伝子定量結果

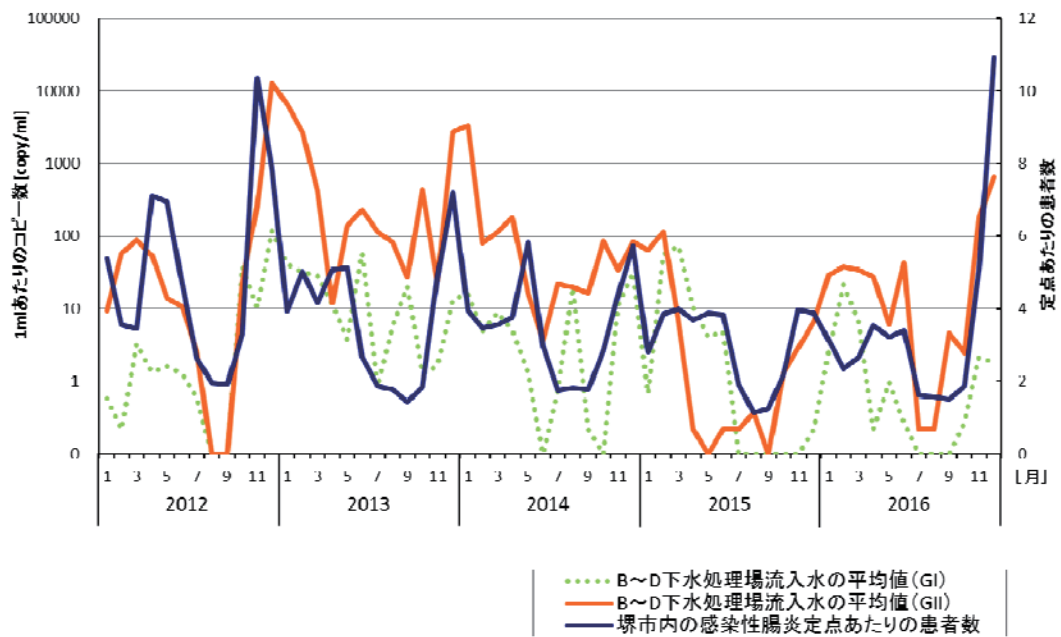


図 3 堺市内の感染性胃腸炎患者数と下水中の NoV 遺伝子定量値

平成 28 年度厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)
「ウイルスを原因とする食品媒介性疾患の制御に関する研究」
研究協力報告

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

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

研究要旨

食中毒調査の精度向上のため、ふき取り検体からのノロウイルス検出法について、検査時間の短縮および検出感度の向上を目的に改良を行った。一般的に、ふき取り検体からのノロウイルス検出には超遠心や PEG 沈殿などのウイルスの濃縮操作を行う。開発した方法(改良法)は、①ふき取り時に綿棒等に浸す液およびウイルスの回収の際の再浮遊液に 0.3%Zwittergent 加 PBS (-) を用いる、②核酸抽出に供する試料の量を増やす、の変更を行ったもので、濃縮行程無しでも効率的にノロウイルスを検出することができた。この改良法を用いて、公共施設のトイレ周辺におけるふき取りによるノロウイルスモニタリング調査を行ったところ、便座裏から高率にノロウイルスが検出された。このことから、流行期の公共施設トイレはノロウイルスの感染リスクが高いことが確認された。

A. 研究目的

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

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

B. 研究方法

1. ふき取り検体からのノロウイルス検出法の改良

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

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

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

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

2. トイレ周辺におけるノロウイルスモニタリング

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

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

(倫理面への配慮)

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

C. 研究結果

1. 改良法の検出率および回収率

結果を表 1 に示した。 $10^1 \sim 10^3$ 倍に階段

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

2. ノロウイルスモニタリング

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

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

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

D. 考察

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

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

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

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

E. 結論

ふき取り検体からノロウイルスを検出

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

感染性胃腸炎流行期の公共施設トイレは、高率にノロウイルスに汚染されており、感染リスクがあることが実証された。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

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

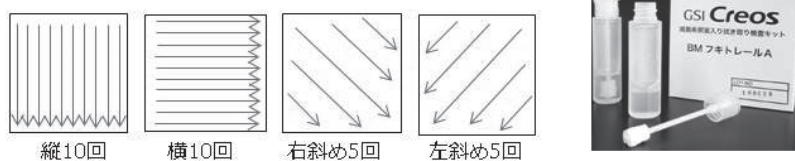
G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得: なし

2. 実用新案登録: なし

3. その他: なし

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



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

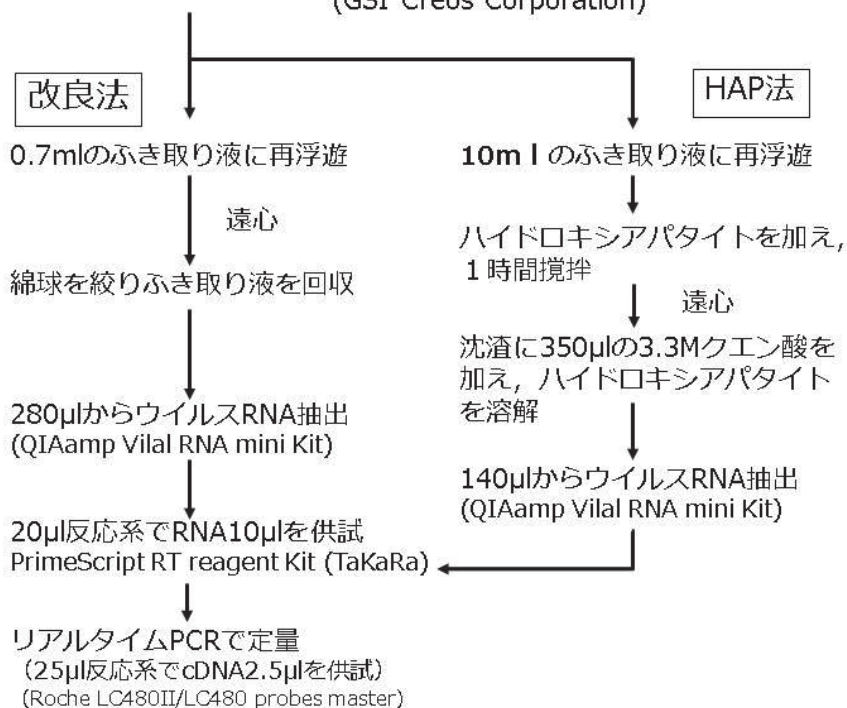


図1 ふき取り方法および改良法・HAP法の検体処理手順

表1 改良法およびHAP法の検出率・回収率

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

表2 ふき取り場所別NoV GII陽性数及び検出遺伝子型

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

表3 NoV GII陽性検体の検体採取日, ふき取り場所及び定量値

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

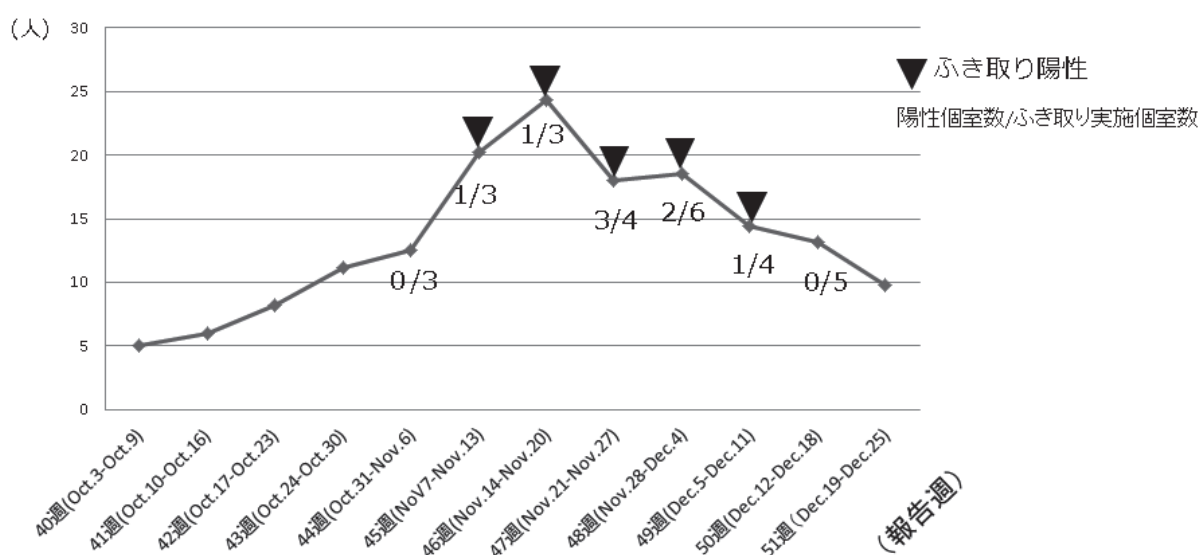


図2 定点当たりの感染性胃腸炎患者報告数（広島県）とふき取り検体からのノロウイルス検出状況

平成 28 年度厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)
「ウイルスを原因とする食品媒介性疾患の制御に関する研究」
研究協力報告

カキからのノロウイルス検出について

研究協力者	山本 美和子	広島市衛生研究所
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	則常 浩太	広島市衛生研究所
研究協力者	藤井 慶樹	広島市衛生研究所
研究協力者	八島 加八	広島市衛生研究所
研究協力者	松室 信宏	広島市衛生研究所

研究要旨

2016/17 シーズンに採取されたカキのノロウイルス(NoV)浸淫状況を把握するとともに、ヒトから検出された NoV 遺伝子型との関連性を調べた。カキからは GII.17 のみが 3 ロットから検出され、それらは Hu/GII/JP/2015/GII.P17-GII.17/Kawasaki308 に近縁な株であった。ヒトからは、全国的に流行している GII.2 が最も多く 5 株検出された。RdRp 領域の解析ができた 2 株はいずれも GII.P16-GII.2 であり、それらは過去に検出された株とは違うクラスターを形成しており、ORF1-2 JCT 領域で組換えが起きた可能性が示唆された。

カキからの NoV 検出法の改良を試みた。阻害物質の除去を目的にアセトンを追加する方法を実施したところ、NoV 検出感度は従来法と同等あるいは若干高い結果であった。

A. 研究目的

カキ等の二枚貝はノロウイルス(NoV)による食中毒の主要な原因食品となっている。一方、カキが関連する食中毒事例から検出される NoV の遺伝子型は GI が比較的多いなど、必ずしも、ヒトで流行している遺伝子型や二枚貝以外の食中毒事例や集団感染事例から検出される遺伝子型と一致するわけではない。そのため、二枚貝から検出される NoV 遺伝子型とヒ

トから検出される遺伝子型に関するデータを蓄積することはカキ関連食中毒の予防や発生要因の解明に重要である。そこで、2016/17 シーズンに採取されたカキの NoV 浸淫状況を調べるとともに、ヒトから検出された NoV 遺伝子型と比較し、両者の関連性を明らかにすることを目的とした。

一方、カキからのウイルス検出検査において、カキに含まれるグリコーゲン等

の阻害物質が検出感度を下げていると考えられる。そこで、検査法を検討し、検出感度の向上を試みた。

B. 研究方法

1. 材料

2016年6月から2016年9月までにA県10海域で採取したカキ4ロット、2016年10月から2017年1月に採取された市販カキ(A県海域)7ロットおよび2016年9月から12月までにNoVが検出された糞便9検体を用いた。

2. 方法

1) カキからのNoV検出法

カキは中腸腺1~2gを1検体とし実施した。

(1) ウイルス濃縮

① アミラーゼ・ポリエチレングリコール(PEG)沈殿法

中腸腺をPBS(-)で10%乳剤とし、 α -アミラーゼ(和光純薬製)を添加した。37°C, 1時間消化した後、4°C, 10,000rpm, 20分間遠心し、上清を回収した。上清にPEG 6000を8%, NaClを2.1g/100mlとなるように添加した。4°Cで一夜静置し、4°C, 10,000rpm, 20分間遠心した。沈渣にDDWを500 μ l(沈渣が多い場合は1ml)添加し、再浮遊させた後、12,000rpm, 5分間遠心した。

② アミラーゼ・アセトン法

中腸腺をバイオマッシャーに入れ、等量のPBS(-)と α -アミラーゼを添加し粉碎・攪拌した。37°C, 1時間消化した後、PBS(-)と等量のアセトンを添加し、攪拌した。4°C, 3,000rpm, 5分間遠心し、3層の場合は中間層、2層の場合は上層の下

部を500 μ l分取した。

(2) NoV検出および遺伝子型別

前処理した検体をQIAamp Viral RNA Mini Kit(QIAGEN)を用いてRNA抽出した。逆転写反応は、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit(ライフテクノロジーズジャパン)およびOligo(dT)Primer(ライフテクノロジーズジャパン)を用いて行った。

増幅用プライマーは、Capsid N/S領域: 1st primer COG1F/G1SKR, COG2F/G2SKR, 2nd primer G1SKF/G1SKR, G2SKF/G2SKRを用い、semi nested PCRにより増幅し、増幅産物をQIAquick Gel Extraction kit(QIAGEN)を用いて精製した。BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit(ABI)でサイクルシーケンシングを行った後、BigDye Xterminator Purification Kit(ライフテクノロジーズジャパン)で精製し、ダイレクトシーケンシングを行い、遺伝子配列を解析し、遺伝子型を決定した。系統樹はMEGA5.05を用い、Neighbor-joining法で作成した。

(3) α -アミラーゼの検出感度の比較

販売中止となった和光純薬製の α -アミラーゼ(015-03731)(以下、旧アミラーゼ)とその後販売された α -アミラーゼ(017-23671)(以下、新アミラーゼ)との検出感度をアミラーゼ・PEG沈殿法で濃縮し、得られたNoV cDNAの実測値コピー数および中腸腺1gあたりのコピー数に換算し比較した。

2) 糞便から検出されたNoV遺伝子型別

糞便はDDWで10%乳剤とし、12,000rpm, 5分間遠心した後、カキからのNoV検出法と同様に実施した。増幅用プライマーは、Capsid N/S領域: COG1F/G1SKR,

COG2F/G2SKR, RdRp 領域:P1/G2SKR を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

C. 研究結果

1. NoV 検出状況

カキからの NoV 検出状況を表 1 に示した。2016 年 6 月以降、6 月に GII.6, 7 月に GII.4 Sydney2012, 11 月, 12 月および 2017 年 1 月から GII.17 が各 1 ロットから検出された。

2016/17 シーズンにおけるヒトから検出された NoV 遺伝子型を表 2 に示した。GII.2 が 5 株, GII.4 が 2 株, GII.3 および GII.17 が各 1 株検出された。集団発生事例は 2 事例のみであったが、いずれも GII.2 が検出された。RdRp 領域の解析ができた 2 株の GII.2 はいずれも GII.P16-GII.2 であった。

VP1 領域(291nt)における NoV GII.17 の系統樹を図 1 に示した。3 ロットのカキおよび糞便 1 検体から検出された NoV はいずれも Hu/GII/JP/2015/GII.P17-GII.17/Kawasaki308 に近縁な株であった。

RdRp 領域(642nt, 213aa)における NoV GII 系統樹を図 2, 3 に示した。2016/17 シーズンに検出された 2 株は、広島市において 2011/12 シーズンから 2013/14 シーズンまでに検出された 7 株とは異なるクラスターに分類されており、入谷らが報告 (IASR Vol. 37p.136-138) した GII.P16-GII.4 Sydney2012 と同じクラスターに分類された。

2012/13 シーズン以降のカキおよびヒトからの NoV 遺伝子型別検出割合を図 4 に示した。2015/16 シーズンを除く過去 3 シーズンは、カキおよびヒトから最も多く検出された遺伝子型が一致していたが、2016/17 シーズン(2017 年 1 月 10 日現在)は一致しなかった。

2. アミラーゼ・アセトン法による NoV GII 検出

同一ロットのカキ A, B, E を用いて行った旧および新アミラーゼ・PEG 沈殿法と新アミラーゼ・アセトン法の実測値コピー数および中腸腺 1g あたりに換算したコピー数の比較を図 5, 6 に示した。

新アミラーゼを使用したアミラーゼ・PEG 沈殿法とアミラーゼ・アセトン法を比較すると、実測値コピー数、中腸腺 1g あたりに換算したコピー数のいずれも同一ロット間でのコピー数の差は認められるものの、全体的にアミラーゼ・アセトン法が同等あるいは若干高い結果となった。

同一ロットのカキ A, B を用いて行った新アミラーゼ・PEG 沈殿法、新アミラーゼ・アセトン法および旧アミラーゼ・PEG 沈殿法の実測値および中腸腺 1g あたりに換算したコピー数の比較では、旧アミラーゼ・PEG 沈殿法が最も高い結果となった。

D. 考察

1. NoV 検出状況

2016/17 シーズンは、ヒトから検出された遺伝子型は GII.2 が 5 株と最も多かったが、カキからは GII.17 のみが 3 ロットから検出された。ヒトから検出された遺伝子型とカキから検出された遺伝子型が異なっており、GII.17 は患者としては把

握されていないものの、軽症者や不顕性感染者は存在していることが推測された。

RdRp 領域の解析ができた 2 株の G II. 2 はいずれも G II. P16 であった。過去に検出された株とは異なるクラスターを形成しており、入谷らが報告した G II. P16-G II. 4 Sydney2012 と同じクラスターに分類された。NoV は ORF1-2 JCT 領域で頻繁に組換えが起こることが知られている。解析できた 2 株も遺伝子組換えを起こした可能性が示唆された。

2. アミラーゼ・アセトン法による NoV G II 検出

新アミラーゼ・アセトン法と新アミラーゼ・PEG 沈法を比較した場合、同一ロット間でのコピー数の差は認められるものの、全体的に同等あるいは若干高い結果となった。旧アミラーゼ・アセトン法と比較するといずれも低い結果となったが、旧アミラーゼはすでに販売中止となっており、新アミラーゼを使わざるを得ない状況となっている。今回、新アミラーゼ・アセトン法を検討し、検出感度はアミラーゼ・PEG 沈法と同等あるいは若干高い結果であったが、アミラーゼ・アセトン法はアミラーゼ・PEG 沈法に比べ、検査時間が短いことや、高速遠心機を使用しなくても検査が可能などのメリットが得られた。

E. 結論

2016/17 シーズンのカキからは NoV G II. 17 が 3 ロットから検出された。いずれも Hu/G II /JP/2015/G II. P17-G II. 17 /Kawasaki308 に近縁な株であった。ヒトからは G II. 2 が 5 株と最も多く検出された。RdRp 領域の解析ができた 2 株はいずれも G II. P16-G II. 2 であった。それらは、過去に検出された株とは異なり、入谷らが報告した G II. P16-G II. 4 Sydney2012 と同じクラスターに分類されたことから、ORF1-2 JCT 領域で組換えが起きた可能性が示唆された。

カキからの NoV 検出法として検討したアミラーゼ・アセトン法の検出感度は、従来法であるアミラーゼ・PEG 沈法と同等あるいは若干高い結果であったが、検査時間の短縮が図れる等のメリットが得られた。

F. 研究発表

1. 論文発表：なし
2. 学会発表：なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

表1 カキからの NoV 検出状況

採取日又は加工日 又は消費期限	採取海域	用途	結果および遺伝子型
2016/06/18	A 県 10 海域	—	G II.6
2016/07/03	A 県 10 海域	—	G II.4 Sydney2012
2016/08/14	A 県 10 海域	—	—
2016/09/10	A 県 10 海域	—	—
2016/10/10	A 県 10 海域	加熱調理用	—
2016/10/28	A 県 14 海域	加熱調理用	—
2016/11/05	A 県 20 海域	加熱調理用	—
2016/11/25	A 県 10 海域	生食用	G II.17
2016/12/03	A 県 12 海域	生食用	—
2016/12/22	A 県 10 海域	加熱調理用	G II.17
2017/01/10	A 県 10 海域	加熱調理用	G II.17

表2 ヒトから検出された NoV 遺伝子型(2016/17 シーズン)

採取日	散発・集団の別	遺伝子型
2016/09/12	散発	G II.2
2016/09/14	散発	G II.3
2016/10/17	集団	G II.P16-G II.2
2016/10/18	散発	G II.4 Sydney2012
2016/10/28	散発	G II.4 Sydney2012
2016/11/10	散発	G II.2
2016/11/24	散発	G II.P16-G II.2
2016/12/01	散発	G II.17
2016/12/13	集団	G II.2

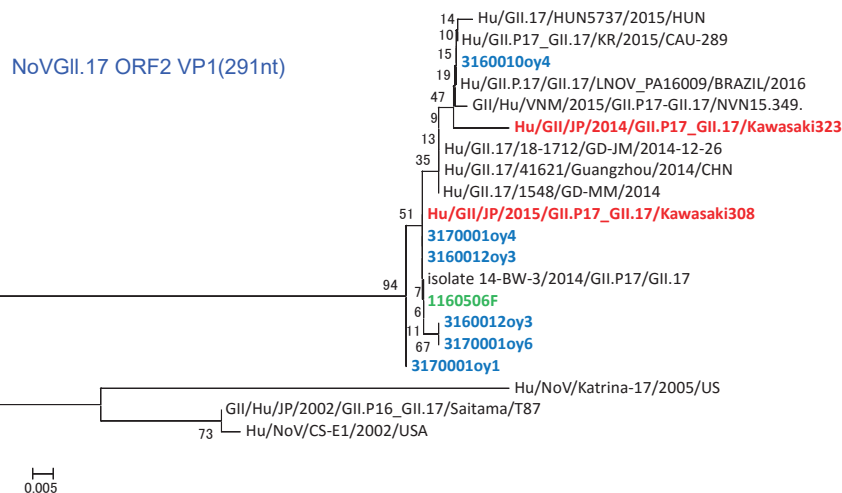


図1 NoVG II.17 系統樹(VP1 領域 291nt)

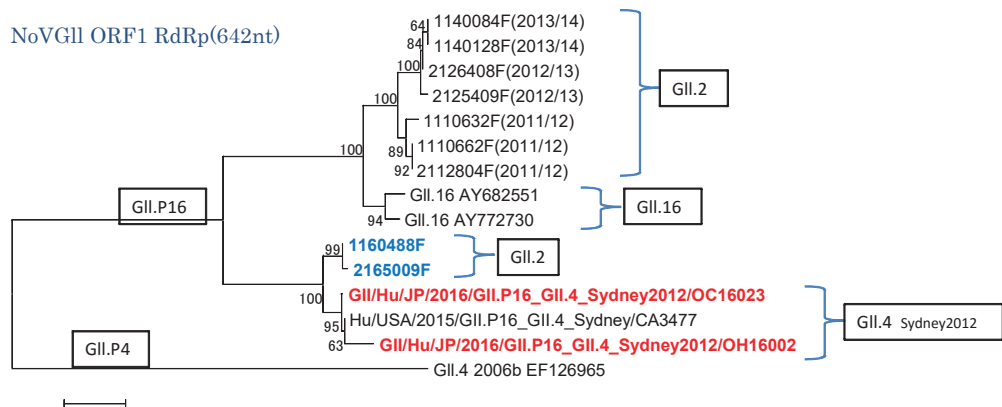


図 2 NoVG II 系統樹(RdRp 領域 642nt)

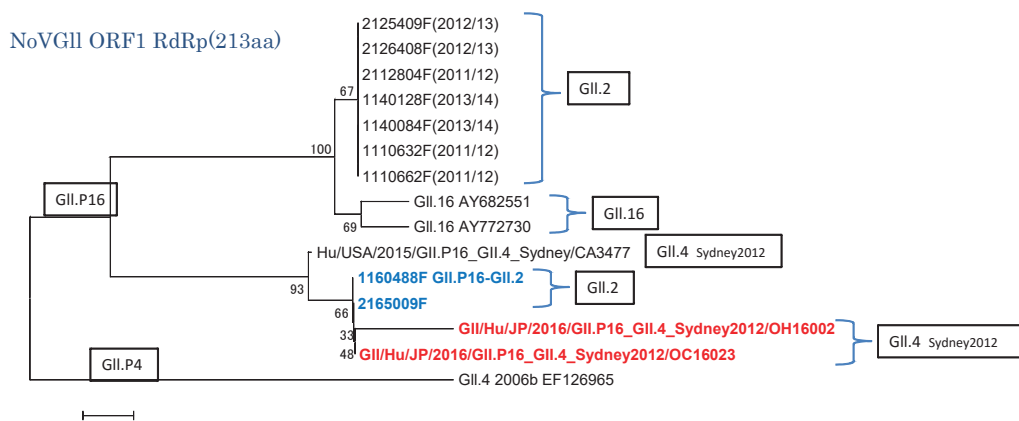


図 3 NoVG II 系統樹(RdRp 領域 213aa)

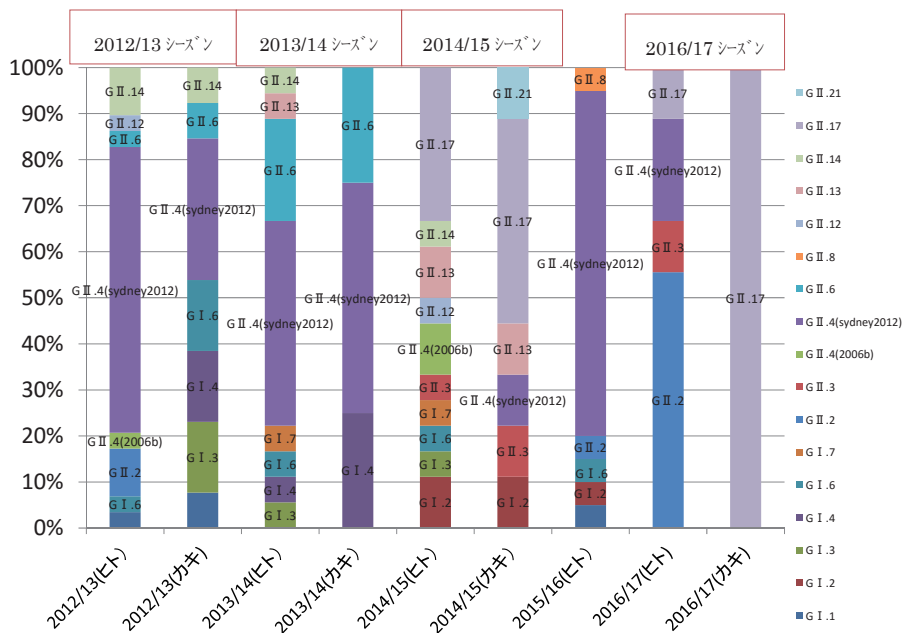


図 4 カキおよびヒトからの NoV 遺伝子型別検出割合

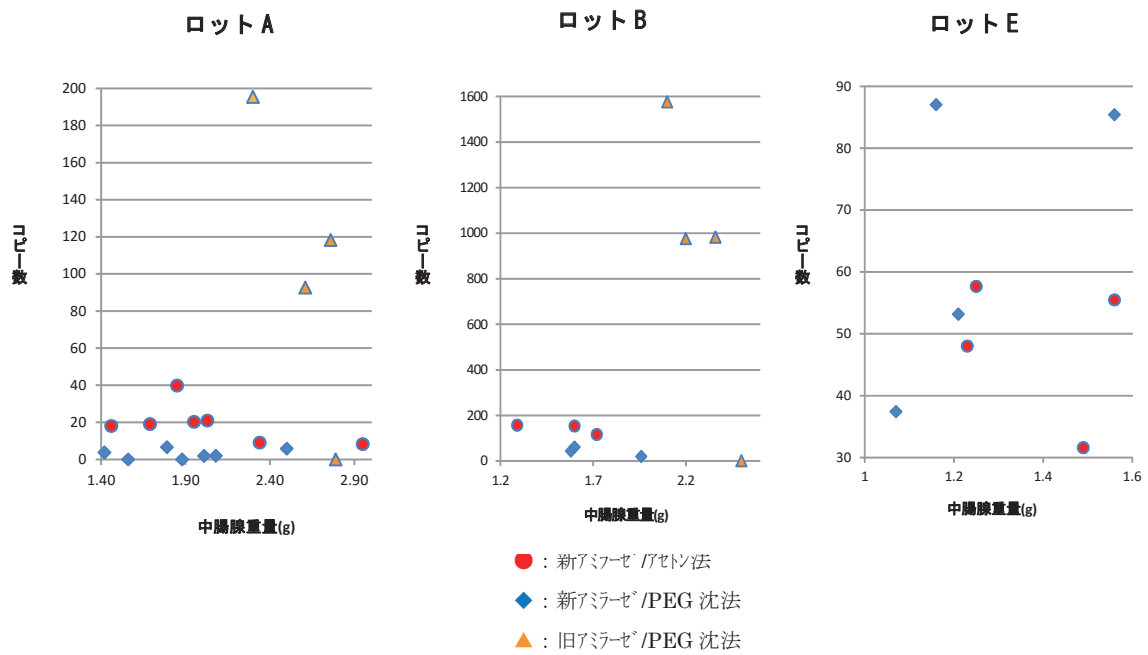


図5 実測値コピー数の比較

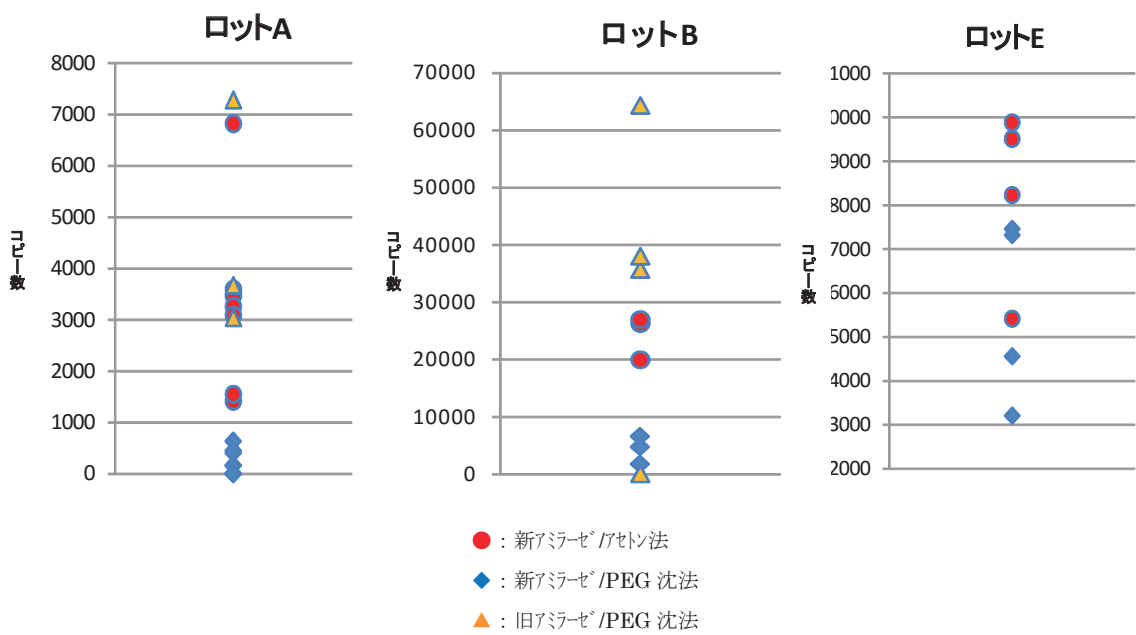


図6 中腸腺 1g あたりコピー数の比較

平成 28 年度厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)
「ウイルスを原因とする食品媒介性疾患の制御に関する研究」
研究協力報告

流入水中ノロウイルスの定量および
市販ノロウイルス検出キットの反応性評価

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

研究要旨

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

A. 研究目的

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

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

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

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

B. 研究方法

1. 材料

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

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

2. 終末処理場流入水からの NoV 検出法

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

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

3. 市販 NoV 検出キットの反応性評価

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

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

1. 終末処理場流入水からの NoV 検出

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

2. 市販 NoV 検出キットの反応性評価

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

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

D. 考察

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

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

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

E. 結論

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

F. 研究発表

1. 論文発表

吉富秀亮、芦塚由紀、野田衛：2015 年

2月の市販カキから検出されたノロウイルスGII.17の分子遺伝学的解析. 福岡県保健環境研究所年報第43号, 114-117, 2016

2. 学会発表

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

月15日, 2016

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

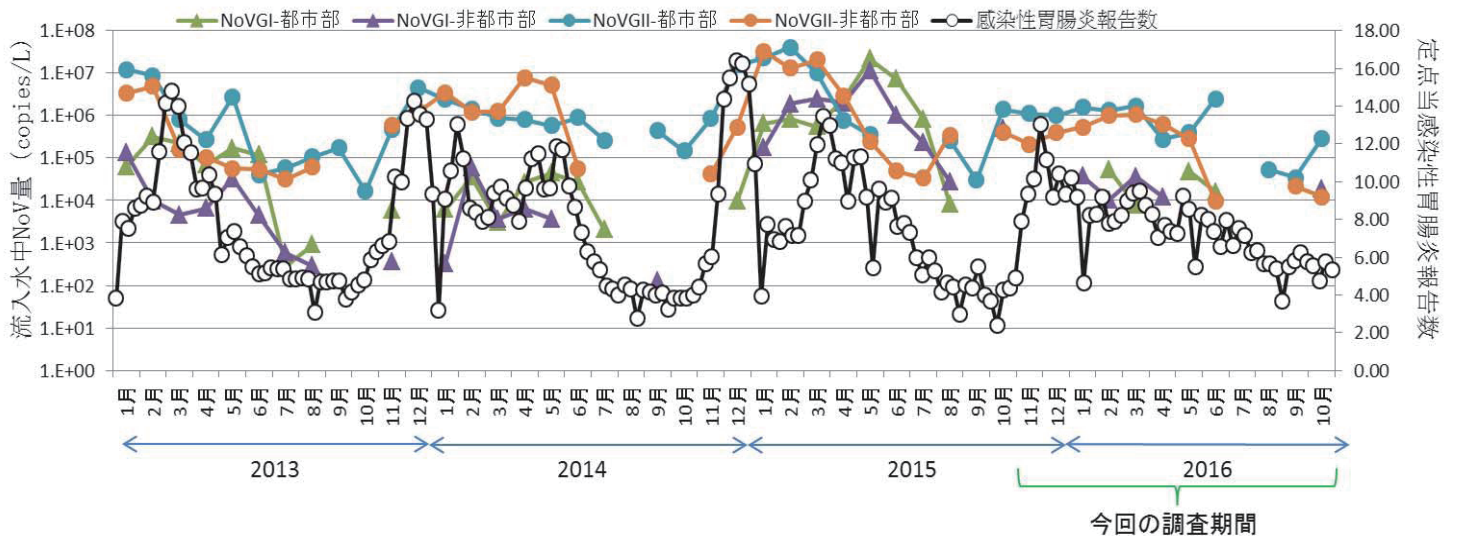


図1 流入水からのNoV遺伝子検出状況と感染性胃腸炎報告数

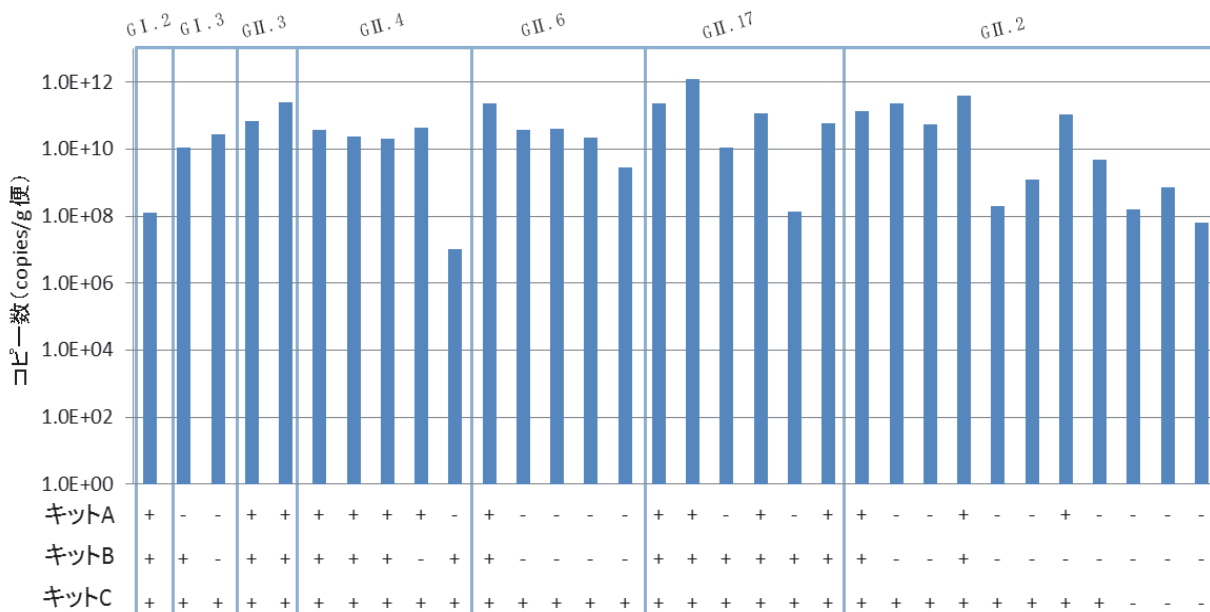


図2 遺伝子型別NoV検出キットの反応性評価結果

研究成果の刊行に関する一覧

研究成果の刊行に関する一覧表

1. 論文発表

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

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

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

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)

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)

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)

Naoki Shigemoto, Yuri Hisatsune, Yasushi Toukubo, Yukie Tanizawa, Yukie Shimazu, Shinichi Takao, Tomoyuki Tanaka, Mamoru Noda, and Shinji Fukuda (2016)Detection of gastroenteritis viruses among pediatric patients in Hiroshima Prefecture, Japan, between 2006 and 2013 using multiplex reverse transcription PCR-based assays involving fluorescent dye-labeled primers., *J Med Virol*, in press

吉富秀亮, 芦塚由紀, 野田衛:2015年2月の市販カキから検出されたノロウイルスGII.17の分子遺伝学的解析. 福岡県保健環境研究所年報第43号, 114-117, 2016

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 年一大阪市, 病原微生物検出情報 月報 37 (No. 437), 21-22 (2016)

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, 38 (1) :5-6 (2017)

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)

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)

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)

2. 学会発表

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

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

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

芦塚由紀, 吉富秀亮, 中村麻子, 小林孝行, 濱崎光宏, 世良暢之, 梶原淳睦, 清水良平, 岡本健太郎, 友枝哲宏, 森 一也, 松尾寿子, 野田 衛 (2016) 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学術総会, 江戸川区, 9/15

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

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

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

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

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

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

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

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)

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

秋野和華子, 斎藤博之, 野田 衛 (2016)市販生カキからのノロウイルス・サポウ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, 江戸川区, 9/15

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

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

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

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-フェージの遺伝子型別, 第 112 回日本食品衛生学会学術講演会, 函館市, 10/27

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)

谷澤由枝, 重本直樹, 高尾信一, 野田 衛 (2016)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の濃縮法の検討, 第 37 回日本食品微生物学会学術総会, 江戸川区, 9/15

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

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