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29年度　総括・研究分担報告書

研究代表者　　野田　衛

平成30（2018）年　3月

目　　次

I.　総括研究報告書

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.　研究分担報告書

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

髙木　弘隆　----------　23

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

髙木　弘隆　他　----------　33

3.　パンソルビンの品質に関する課題への対応

斎藤　博之　他　----------　37

4.　ウイルスの食品検査の精度管理

鈴木　達也　他　----------　57

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

上間　匡　他　----------　83

6.　腸管系病原ウイルス培養細胞の探索に関する研究

上間　匡　他　----------　89

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

上間　匡　他　----------　91

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

野田　衛　他　----------　99

9.　ノロウイルスの排便後の拡散の実証実験とその対策

野田　衛　他　----------　105

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

野田　衛　他　----------　111

11　手洗いの実施状況に関する検証について

野田　衛　他　----------　115

III.　研究協力報告書

1.　食中毒事例における調理従事者および患者由来ノロウイルスの
遺伝子学的解析

吉澄　志磨　他　----------　125

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（2012/13～2016/17 シーズン）
坂　恭平　他 ---------- 131
3. 岩手県におけるノロウイルスの発生動向について
高橋　知子　他 ---------- 139
4. 秋田県内で市販されている二枚貝からのノロウイルスの検出および
2016/2017 シーズンのノロウイルスの検出状況
秋野　和華子　他 ---------- 145
5. 宮城県における感染性胃腸炎の流行状況と過去 7 シーズンとの比較
植木　洋　他 ---------- 155
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（第二報）
田村　務　他 ---------- 165
7. 東京都内におけるノロウイルスを原因とした食中毒疑い事例等での
遺伝子型解析(2016/17 シーズン)
宗村　佳子　他 ---------- 171
8. 川崎市における二枚貝のノロウイルス検出状況
清水　智美　他 ---------- 175
9. 施設フキトリ，調理従事者および患者等から検出されたノロウイルスの
遺伝子解析，胃腸炎事例から検出されたノロウイルスの分子疫学的解析
および生食用カキのノロウイルス汚染調査
入谷　展弘　他 ---------- 181
10. ノロウイルスふき取り調査及び下水サンプルを用いた腸管感染ウイルス
の流行解析
三好　龍也　他 ---------- 189
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 ---------- 197
12. カキからのノロウイルス検出法の検討について
山本美和子　他 ---------- 205
13. 流入水中ノロウイルスの定量および抗ノロウイルス活性のある化合物
の探索
小林　孝行　他 ---------- 211

IV. 研究成果の刊行に関する一覧 ---------- 219

平成 29 年度厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)
「ウイルスを原因とする食品媒介性疾患の制御に関する研究」
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および被害の拡大を効果的に低減するための手法の確立を目標として以下の研究を実施した。

1.　食中毒検査体制の強化に関する研究

9 機関を対象にノロウイルス定量検査の外部精度管理を実施した結果，食品検体を用いても概ね良好な結果が得られた。パンソルビン・トラップ法において，パンソルビン試薬のホルマリン固定の程度が弱い製品ではウイルス回収率が低下することが判明したが，再固定プロトコールを付加することで，これまでどおり使用することができた。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の一致/不一致は，RdRp 領域から VP1 全長のより長い配列を用いた場合の一致/不一致と概ね一致した。昨年度開発した迅速簡便なふき取りからのウイルス検出法に食品添加物に指定されている Tween20 を用いることで一定のウイルス回収率が得られた。カキからのノロウイルス検出法として開発したアセトン処理法における添加するアセトンおよびアミラーゼの量の至適化を行った。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。2016/17 シーズンは，GII.2，GII.17，GII.4(Sydney2012)などが主要流行株であった。2017/18 シーズンのノロウイルスの流行は低調で，施設の拭き取り検査からもそれが示唆された。特定の細胞/コール酸の培養系でヒトサポウイルスにおいて培養上清中のウイルス RNA シグナル増加およびコピー数の経時的増加を認めた。サポウイルスの分離の成否に接種材料の調整法が関与している可能性が示唆された。Caco-2 細胞，INT407 細胞，HT29/219 細胞の 3 種類の培養細胞についてウシ胆汁，ブタ胆汁酸，5 種類のコール酸(CA ，DCA ，GCA ，GCDCA ，CDCA)，マレイン酸，オレイン酸について，細胞毒性を示さない最大の添加量を決定した。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，交差汚染を起こすリスクが示された。2017 年 1 月から 2 月にかけて東京都をはじめとする複数の自治体で発生した刻み海苔による大規模食中毒事件において食品や施設の拭き取りからのウイルス検出およびその塩基配列の比較がその調査に大きく寄与した。

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，手洗いする方法について，その手洗い効果をバクテリオファージで検証した結果，その有用性が示された。ネコカリシウイルスおよびマウスノロウイルスを用いて，天然生理活性物質 120 化合物について抗ノロウイルス活性の評価を行ったところ,14 化合物が抗ウイルス活性を示した。ヒトノロウイルス不活性化評価にかかる代替ウイルスの選定およびその方法について検討し，3 種類のウイルス(ネコカリシウイルス F9 株，ネコカリシウイルス ym3 株およびコクサッキーA6 型ウイルス)をその候補として決定した。CB5 ウイルスはエタノールに対し高感受性であることから，エタノール系消毒剤の評価ではノロウイルスの代替ウイルスとしては不適切であると考えられた。健康管理において，ノロウイルス感染に比較的共通してみられる胃部の異常，便性状の変化，倦怠感などを把握することがノロウイルス感染者の把握に重要であることが示唆された。ノロウイルスに感染した従事者がトイレで排便した場合，作業着の汚染を介して食品取扱室にウイルスを持ち込む可能性があることが示唆された。手袋を着用してのトイレの利用は，作業着等への汚染防止の手段として有用である。　2017 年 1 月から 2 月に発生した刻み海苔関連食中毒事件において，和歌山県御坊市での事例では一人が 6,250 コピーのノロウイルスを摂取したと推定された。また，海苔の刻み作業を行った感染者の便中のウイルス量は，約 10^9/g であったと推定された。

研究分担者

髙木　弘隆	国立感染症研究所
斎藤　博之	秋田県健康環境センター
鈴木　達也	一般財団法人食品薬品安全センター
上間　匡	国立医薬品食品衛生研究所

研究協力者

岡　智一郎	国立感染症研究所
中阪　聡亮	一般財団法人食品薬品安全センター
吉澄　志磨	北海道立衛生研究所
後藤　明子	同上
大久保　和洋	同上
石田　勢津子	同上
坂　恭平	青森県環境保健センター
菩提寺　誉子	同上
筒井　理華	同上
秋野　和華子	秋田県健康環境センター
高橋　知子	岩手県環境保健研究センター
植木　洋	宮城県保健環境センター
小泉　光	同上
田村　務	新潟県保健環境科学研究所
林　真由美	同上
広川　智香	同上
新井　礼子	同上

宗村　佳子　東京都健康安全研究センター
永野　美由紀　同上
木本　佳那　同上
小田　真悠子　同上
奥津　雄太　同上
新開　敬行　同上
清水　智美　川崎市健康安全研究所
清水　英明　同上
入谷　展弘　大阪健康安全基盤研究所
山元　誠司　同上
改田　厚　同上
阿部　仁一郎　同上
久保　英幸　同上
三好　龍也　堺市衛生研究所
中谷　誠宏　同上
岡山　文香　同上
福井　陽子　同上
内野　清子　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
兼重　泰弘　同上
藤井　慶樹　同上
松室　信宏　同上
小林　孝行　福岡県保健環境研究所
吉冨　秀亮　同上
中村　麻子　同上
芦塚　由紀　同上
梶原　淳睦　同上
永田　文宏　国立医薬品食品衛生研究所
永嶋　俊樹　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，遺伝子が変異し検出できないなどの事例も認められており，より簡便かつ網羅的な検査法の確立が求められている。また変異株の出現を早期に探知し，被害拡大前にあらかじめ検査法を構築するためには食品や環境のウイルスサーベイランスが不可欠である。食品ウイルス検査は外部精度管理体制が確立されていないため信頼性が確保されておらず，検査の信頼性確保も急務の課題である。一方，飲食店や大規模調理施設等における，食品従事者からの二次感染を効果的に予防するためには，手洗い，環境・トイレの清掃・消毒等が確実に実施されていることを検証するための簡便な方法，現場に応じたウイルスの除去方法の確立が求められている。さらに現在ノロウイルスに有効とされる各種消毒剤が市販されているが，不活化試験の検査法が定まっていないこと等から有効性を客観的に判断することができず，試験法のガイドラインが求められている。

本研究では，近年，件数･患者数ともに増加傾向にある，ノロウイルス，サポウイルス，E 型肝炎ウイルス等のウイルスによる食品媒介性疾患の発生および被害の拡大を効果的に低減するための手法の確立を目標とする。

B. 研究方法

1. 食中毒検査体制の強化に関する研究

(1) 食品のウイルス検査の精度管理

国内で食品のノロウイルス検査を実施している 9 機関を対象として，7 検体〔ウイルス懸濁液：3 検体，食品：3 検体(3 検体はいずれも同一濃度)および陰性検体：1 検体〕および標準 DNA 溶液を調査検体として配布し，定量検査を各検査機関にて実施した後，回収した結果の解析を行った。検査方法はあらかじめ指定した共通の方法とし，検量線作成用陽性コントロール溶液も共通とした。

(2) 食中毒調査等に係る検査法の開発・改良・評価

① パンソルビンの品質に関する課題への対応

食品検体からのウイルス検出法であるパンソルビン・トラップ法に使用するパンソルビンの 2015 年以降に購入したロットについてホルマリン固定の程度が弱くなっていることが判明した。このことはウイルス回収率の低下をもたらす原因になることから，その対応法を検討した。

② 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の有用性について，実際の食中毒事例等において検証した。一部においては，RdRp 領域からVP1全長のより長い領域について塩基配列を決定し，通常の検査で実施している領域の解析の妥当性について調べた。

③ ふき取り検体からのウイルス検出法の改良

昨年度開発した迅速簡便なふき取りからのウイルス検出法に食品添加物に指定されている界面活性剤の使用を検討した。

④ 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法として有用性が認められたアセトン処理について，添加するアセトンおよびアミラーゼの至適量を検討した。

(3) サポウイルスおよびノロウイルスの培養法に関する検討

ブタサポウイルスの培養系を参考に，異なる細胞およびコール酸の組み合わせで，培養系を構築し，サポウイルス陽性材料を添加し，培養を試みた。5～8日培養後，培養上清を回収し，ウイルスRNA量を測定した。また，接種材料中の感染性を持つウイルス量を推定した。

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

(4) 食品媒介ウイルスの食中毒事例，胃腸胃炎事例，下水，食品および拭き取りからの検出と遺伝子解析

岩手県，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。

青森県，岩手県，宮城県，秋田県，東京都，大阪市，堺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，川崎市において，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，ヒトからの検出ウイルスと比較した。

大阪市，堺市，広島県において食中毒事件における拭き取りあるいは食品取扱施設や公共施設のトイレの拭き取りを継続的に実施した。

2. 調理従事者からの二次汚染防止に関する研究

(1) ノロウイルスの不活化

抗ノロウイルス活性を持つ化合物の探索を目的に，ネコカリシウイルスおよびマウスノロウイルスを用いたスクリーニング系を導入し，120の化合物について評価を行った。

(2) 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た6種類のウイルス(ネコカリシウイルス1株，エンテロウイルス71型，ヒトパレコウイルス1型，コクサッキーA6型ウイルス，コクサッキーB3型ウイルス，コクサッキーB5型ウイルス)について，NaClO (原液有効塩素5%)，エタノール(EtOH 99.5%)，過酸化水素(H_2O_2，原液30%)，炭酸ナトリウム(Na_2CO_3，0.5～1%)に対する感受性を調べ，ノロウイルスの代替ウイルスとしての評価を行った。

(3) 効率的な手洗いの方法の検討

ノロウイルスの代替ウイルスとして，MS2ファージを使用して，汚染前の水溶性高分子ポリマーによる手指のコーティングが，手洗い後に手に残存するウイルス汚染を減らす効果があるかどうか評価した。3人の被験者についてファージで手指を汚染し，A：手洗い無し，B：水のみの手洗い，C：ハンドソープによる手洗い，D： 3%カルボキシメチルセルロースの45%エタノール液(CMC液)によるコーティング後にファージで汚染し水洗いを実施して，手に残存したファージをグローブジュース法で回収し，ファージ濃度を定量した。

(4) ノロウイルス感染における臨床症状の把握

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

(5) ノロウイルスの排便後の拡散の実証実験

排便後に手指や臀部が汚染された場合，その後どのように汚染が拡大していくのか実証実験を行った。また，トイレ使用時における手袋の着用が，二次汚染防止に有効であるかを検証した。

(6) 食品等の汚染ウイルス量の推定

2017年1月に和歌山県御坊市で発生した磯和えによる集団食中毒事例において，原因食品とされる磯和えからreal time

PCRによりノロウイルス遺伝子が検出され，磯和えに含まれるノロウイルス遺伝子のコピー数は1gあたり125コピーと推定された。この値を基に摂取されたウイルス量や汚染源と推定される感染者の糞便中のウイルス量などの推定を行った。

(7)　手洗いの実施状況の検証

食品取扱業者における手洗いの実施状況等について調査を実施した。

(倫理面への配慮)

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

C.　研究結果

1. 食品等からのウイルス検出法および遺伝子解析法の開発

(1)　食品のウイルス検査の精度管理

検量線作成では 1 機関において 2 回の測定でばらつきが認められたが，測定傾向は同じであった。一方，標準 DNA 溶液では実測値における変動係数が 0.009 と非常に小さいものであり，精度良く PCR 操作が実施されているものと考えられた。これに対して，ウイルス懸濁液では変動係数が約 0.1 であった。さらに今回初めてきな粉を基材とした食品検体を採用し，濃縮工程を含めた外部精度管理調査を行ったところ，変動係数は従来方式において 0.3～0.4 を示した。また，国際的に推奨されているロバスト統計量を算出したところ，変動係数はウイルス懸濁液では約 0.12，模擬食品検体では 0.2～0.3 となった。

(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　パンソルビンの品質に関する課題への対応

パンソルビンの出荷基準は，一定量以上の IgG を吸着できるかどうかであり，核酸漏出については規定されていない。製品としては正常であることから，メーカー側に対応を求めることは困難であり，使用者側で問題解決を図る必要がある。そこでパンソルビンからブドウ菌由来核酸の漏出が起こらないように再固定プロトコールを考案した。再固定を行うことで，問題発生前に購入したパンソルビンと同等以上の回収率が得られた。再固定法のマニュアルを作成した。

(斎藤研究分担報告)

②　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。しかし，一部の事例において，検出用プライマー内の配列の比較結果ではみえなかった不一致が多く検出された。

(吉澄研究協力報告)

青森県で2012年9月～2017年8月に発生した集団胃腸炎事例の内，調理従事者からノロウイルスが検出された食中毒 14 事例の遺伝子解析を行った。その結果，11 事例の調理従事者由来株と発症者等由来株の塩基配列の相同性は 100%であった。他の 3 事例では，塩基配列が異なるケースが認められた。

（坂研究協力報告）

③　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食品添加物に指定されている界面活性剤の使用を検討した結果，Tween20 で一定のウイルス回収率が得られた。

（谷澤研究協力報告）

④　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添加回収試験の結果，アセトン処理法は中腸腺1gに対し250μlのアセトンを添加した場合に実測値コピー数が高い結果となった。アミラーゼ溶液の添加量では検出感度に違いはみられなかった。一方，PEG沈殿法でカキを濃縮した場合は，中腸腺1gに対し10μlのアミラーゼ溶液を添加した場合に実測値コピー数が高いことが示唆された。

（山本研究協力報告）

(3)　食品媒介ウイルスの食中毒事例，胃腸胃炎事例，下水，食品および拭き取りからの検出と遺伝子解析

青森県で 2016/17 シーズンに発生したノロウイルス食中毒事例から検出された遺伝子型はGII.2 であった。

（坂研究協力報告）

岩手県のノロウイルスによる集団発生は，2014/15，2015/16 シーズンの GII.4 と GII.17 の流行や，2016/17 シーズンの GII.2 による大流行において他県と同様の傾向であった。食中毒事例において，無症状の調理従事者の中に約 12%の不顕性感染者が認められた。2014 年 9 月から 2017 年 11 月の下水の調査では 2014/15 シーズン，2015/16 シーズンに多発した GII.17，2016/17 シーズンに多発した GII.2 は集団発生が起こる約 3 か月前から流入下水から検出された。

（高橋研究協力報告）

秋田県において 2016 年～2017 年に購入した生アサリから GII.2(中腸腺 1g あたり 10^2以上 10^3未満)，GII.4 Sydney 2012，GI.7(10^1以上 10^2未満)が検出された。砂抜き液は不検出であった。パック入り生カキからはGII.2，GII.3，GII.17(いずれも 10^2以上 10^4未満)，GI.2，GI.4 が検出された。パック充填の浮遊液は 1 検体からGII.17(9.39/ml)が検出された。岩カキでは GII.4 Sydney 2012，GII.17 がそれぞれ 1 検体から検出された。2016/2017 シーズンの食中毒事例は，カキが推定原因食品であった 1 事例のみでノロウイルス GII.2 が検出された。集団感染事例および感染症発生動向調査において検出されたノロウイルスの遺伝子型は，GII.2 が最も多く，次いで GII.4 Sydney 2012 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。2017/18 シーズンは前シーズンと比較して，サポウイルスは年間を通して昨シーズンよりも高い濃度で検出さ

れた。2010/11 シーズンから 2017/18 シーズンに県内で検出されたノロウイルスの遺伝子型は GII.4 が期間を通じて最も多かった。一方, シーズンによってはGII.2, GII.3, GII.17 による流行も確認された。

(植木研究協力報告)

2016/17 シーズンの東京都におけるノロウイルスを原因とする食中毒疑い等の集団発生事例 210 例から検出された遺伝子型は, GII.2 が 65.7%(138/210)で最多であり, 次いでGII.17 が 11.9%(25/210), GII.4 が 9.0%(19/210)であった。2017 年 2 月には, 学校給食で提供された「刻み海苔」を原因とした大規模な食中毒が都内で 4 事例発生したが, その遺伝子型はGII.P17_GII.17 であり事例間および刻み海苔と患者間でその配列は一致した。

(宗村研究協力報告)

川崎市において, 市内の河川に生息する二枚貝および市内で流通する二枚貝についてノロウイルス検査を行った。2017 年 8 月および 10 月に採取した河川のシジミから GII.2, GII.4 および GII.17 が検出された。8 月, 10 月および 12 月に市内で購入した市販のシジミの汚染率は 5.6%であった。10 月および 12 月に市内で購入した市販の生食用生カキの 25.0%から遺伝子型別不能の GI が検出された。

(清水研究協力報告)

大阪市において施設フキトリまたは調理従事者からノロウイルスが検出された食中毒(疑いを含む)事例において調査した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, 塩基配列は一致した。

食品汚染後約 2 か月後に起こった広域食中毒事件では施設フキトリの検査結果が汚染経路の解明につながる科学的根拠となった。2017 年の集団胃腸炎 46 事例で最も多く検出された遺伝子型は GII.4 Sydney_2012 で。次いで GII.2 であった。2017 年 12 月に購入した市販の生食用カキにノロウイルス汚染は認められなかった

(入谷研究協力報告)

堺市において 31 施設 179 検体の拭き取り検体についてノロウイルス遺伝子検出を試みたが, すべて陰性であった。模擬拭き取り検体を用いたノロウイルス遺伝子検出期間に関する検討では, 汚染後 1 ヶ月以上検出されることが考えられた。

下水サーベイランスにおいて, ノロウイルスでは臨床検体と下水検体から得られた結果は, よく相関していた。その他のサポウイルス等については, 臨床検体からの検出頻度は低かったが, 下水検体からは高頻度に検出された。

(三好研究協力報告)

広島県において昨年度に引き続き, 公共施設トイレについてふき取りによるノロウイルスのモニタリング調査を実施したところ, 昨年度と比較してトイレのノロウイルス汚染は少なかった。

(谷澤研究分担報告)

福岡県において, 終末処理場流入水からのノロウイルス検出を行った。2016/17 シーズンは, 2016 年 11 月から GII の定量値が増加し始め, 2017 年 1 月にピークを示した。また, 感染性胃腸炎の報告数は 2016 年 12 月にピークを示し, 両者の動態に関連が認められた。

(小林研究協力報告書)

(4)　サポウイルスおよびノロウイルスの培養法に関する検討

供試した細胞とコール酸類の組合せにより，そのいくつかの培養上清にウイルス RNA の強いシグナルが確認された。また別法により RNA コピー数を測定したところ経時的な増加が認められ，増加率は10^3～10^4倍であった。これらはヒトサポウイルス GI,GII,および GIV で確認された。

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

（髙木研究分担報告）

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

（上間研究分担報告）

2.　調理従事者からの二次汚染防止に関する研究

(1)　ノロウイルスの不活化に関する研究

ネコカリシウイルスおよびマウスノロウイルスを用いたスクリーニング系により，評価を行った120化合物のうち，14化合物においてネコカリシウイルスまたはマウスノロウイルスに対して抗ウイルス活性が認められた。

（小林研究協力報告）

(2)　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

供試した 6 種類のウイルスについて NaClO（原液有効塩素 5%），エタノール(EtOH 99.5%)，過酸化水素(H_2O_2，原液 30%),炭酸ナトリウム(Na_2CO_3,0.5～1%)に対する感受性を調べたところ，不活化効果は使用した株によって顕著な違いが認められた。今年度および昨年の結果を総合的に判断し，ネコカリシウイルスＦ9 株，ネコカリシウイルス ym-3 株およびコクサッキーA6 型ウイルスの 3 種類のウイルス株が代替ウイルスとして適当であると判断した。

（髙木研究分担報告）

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

（上間研究分担報告）

(3)　効率的な手洗いの方法の検討

A：手洗い無し，B：水のみの手洗い，C：ハンドソープによる手洗い，D：3%カルボキシメチルセルロースの45%エタノール液(CMC液)によるコーティング後にファージで汚染し水洗いの4法による手洗い後のファージ濃度(平均値)はそれぞれ A ： 623pfu/ml ， B ： 27.6pfu/ml ， C:42.6pfu/ml，D:2.2pfu/mlで，Dが最も濃度が低かった。

（田村研究協力報告）

(4)　ノロウイルス感染における臨床症状の把握

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

(野田研究分担報告)

(5) ノロウイルスの排便後の拡散の実証実験

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

(野田研究分担報告)

(6) 食品等の汚染ウイルス量の推定

2017年1月に和歌山県御坊市で発生した集団食中毒事例において，一人あたり磯和えを50g食べたと仮定すると，一人が6,250コピーのノロウイルスを摂取したと計算された。また，汚染が生じた磯和えが約800人分程度と仮定すると，本事例に提供された磯和え全体として5×10^6コピーの汚染があったと計算された。一方，汚染源と推定される海苔の刻み作業を行った感染者の便中のウイルス量は，約10^9/g程度であったと推定された。

(野田研究分担報告)

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

国際的に推奨されているロバスト方式による解析によってもこれまでの算術的に求めた統計量と同等の統計量が得られることがわかった。また，食品検体を採用することにより，検査工程の増加に伴いウイルス懸濁液と比較すると変動係数は大きくなるものの，精度管理を評価するには問題のない程度のばらつき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 パンソルビンの品質に関する課題への対応

パンソルビンの再固定はパンソルビンを購入後に 1 回だけ行えばよく，以後は長期保存してこれまでどおり使用できることから，試験検査機関における負荷も最小限で済ませられるものと考えられた。

(斎藤研究分担報告)

② 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，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。しかし，一部の事例において検出用プライマー内の配列の比較結果ではみえなかった不一致が多く検出された事例もあったことから，さらにデータを集積し比較検討を必要性が示

唆された。

（吉澄研究協力報告）

青森県で，同一食中毒事例内で，同じじ遺伝子型でも数塩基異なる検体がみられた。異なる病原体が感染した場合，感染後に遺伝学的な変異が発生した場合，PCR やシークエンス反応において塩基の読み違いを起こした場合など，様々な可能性があるので，食中毒の判断・詳細な把握のためには，今後も引き続きデータを蓄積し，解析していく必要がある。

（坂研究協力報告）

③　ふき取り検体からのウイルス検出法の改良

昨年度開発した方法で検査に使用する界面活性剤(Zwittergent)は，人体への影響が懸念され，調理環境等でふき取りを行う際には注意が必要である。今回の結果より，食品添加物に指定されている界面活性剤がZwittergentの代用品として有用である可能性が示唆された。今後はZwittergenntに近い性質を持ち，食品添加物に指定されている界面活性剤で，更に検討を行う必要がある。

（谷澤研究協力報告）

④　カキからのウイルス検出法の改良

アセトン処理法において添加するアセトンおよびアミラーゼの至適添加量を決定した。しかし，カキからのウイルスの回収は若干の検出感度が良くなる程度にとどまった。今後も引き続き検査法の検討を行う必要があると思われる。

（山本研究協力報告）

(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。2016/17シーズンはGII.2(青森県，岩手県，秋田県，東京都，川崎市，宮城県，大阪市，堺市)，GII.17(秋田県，東京都，川崎市，大阪市)，GII.4(秋田県，宮城県，東京都，川崎市，大阪市)，などが主流であった。2017年2月には，学校給食で提供された「刻み海苔」を原因とした大規模な食中毒が東京都内で4事例発生したが，その遺伝子型はGII.P17_GII.17であり事例間および刻み海苔と患者間でその配列は一致した。また当該事例において，施設フキトリ由来ノロウイルスの遺伝子解析結果が汚染経路の解明につながる重要な科学的根拠となった。

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。今年は，岩手県，宮城県，堺市，福岡県において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で検出される遺伝子型に相関がみられた。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。

堺市における調理施設のふき取り調査では，ノロウイルスは検出されなかった。聞き取り調査から，衛生管理が良く行われている施設であったことや，調査期間にはノロウイルスの大きな流行がみられていないことなどの要因により，検出されなかった可能性が考えられる。模擬ふき取り検体で，1ヶ月保存後もノロウイルス遺伝子が検出された。実際の事例において，ふき取り検査陽性の解釈に注意が必要と考えられる。

広島県の公共施設のトイレの拭き取り調査においても，2017/18シーズンのノロウイルス検出率は昨年度と比較して低く，当シーズンの感染性胃腸炎患者が少ない状況を反映しているものと考えられた。

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。秋田県および川崎市の調査で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。秋田県の調査で，生カキのパック充填液からノロウイルスGII.17が検出され，交差汚染のリスクが示された。川崎市の調査で10月購入市販生食用カキ2検体および12月購入の1検体から，塩基配列がほぼ一致するGIが検出されたが，既知の遺伝子型に分類されなかった。遺伝子型が未分類であることから，報告数が稀な株であり，ヒトには感染しない又はヒトに対して病原性を持たないことが推測される。

(4)　サポウイルス，ノロウイルスの培養法の検討

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

(髙木研究分担報告)

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

(上間研究分担報告)

2.　調理従事者からの二次汚染防止に関する研究

(1)　ノロウイルスの不活化

今回，ネコカリシウイルスおよびマウスノロウイルスを用いて，天然生理活性物質120化合物について抗ノロウイルス活性の評価を行ったところ，14化合物が抗ウイルス活性を示した。しかし両ウイルスに効果を示す化合物はみつからなかった。今後も化合物のスクリーニングを継続し，抗ノロウイルス活性物質としての活用が期待される物質の探索を行う必要がある。

(小林研究分担報告)

(2)　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

2年間にわたり，ヒトノロウイルス不活性化評価にかかる代替ウイルスの選定およびその方法について検討し，今回 3 種類のウイルス(ネコカリシウイルスF9株，ネコカリシウイルス ym3 株およびコクサッキーA6 型ウイルス)をその候補として絞り込んだ。今後これらを用いての評価条件設定や市販製剤などによる評価の妥当性・再現性について検証する。

(髙木研究分担報告)

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

(上間研究分担報告)

(3)　効率的な手洗いの方法の検討

CMC液によるコーティングを実施して水洗いする方法が，最も手に残るファージ量が少なかったことから，トイレの前に手指をこれらのコーティング剤を塗布することで，トイレ後の手洗いにおいて，トイレ中のウイルスの手指汚染を効率的に洗い流すことができると考えられた。

(田村研究協力報告)

(4)　ノロウイルス感染における臨床症状の把握

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

(野田研究分担報告)

(5)　ノロウイルスの排便後の拡散の実証実験

食品取り扱い施設内においてトイレを使用する場合には，作業着の脱衣，靴の履き替え，手洗いの励行だけでは十分とは言えないと考えられた。致し方なく，

下痢時に食品取り扱い施設内のトイレを使用する時は，可能な限り汚染防止に注意を払い排便し，用便後は，最大限に念入りな手洗いを心がけるとともに施設の責任者に報告し，汚染防止対策を徹底することが肝要である。一方，トイレ使用時の手袋の着用は二次汚染防止策のひとつとして有用と考えられた。

（野田研究分担報告）

(6)　食品等の汚染ウイルス量の推定

2017年1月から2月に発生した刻み海苔関連食中毒事件の汚染源と推定される海苔の刻み作業を行った感染者の便中のウイルス量は，約10^9/g程度であったと推定された。この汚染量は一般的なノロウイルス感染者の便中のウイルス量と比較して，特段多いわけではなく，通常のノロウイス感染者がこのような大規模食中毒を起こし得る可能性があると考えられた。

（野田研究分担報告）

E.　結論

1.　食中毒検査体制の強化に関する研究

- 9 機関を対象にノロウイルス定量検査の外部精度管理を実施した結果，食品検体を用いた際にも参加機関の評価を実施するに耐え得る統計量が得られた。
- パンソルビン・トラップ法において，パンソルビン試薬のホルマリン固定の程度が弱い製品ではウイルス回収率が低下することが判明した。しかし，再固定プロトコールを付加することで，これまでどおり使用することができた。
- 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が，一部の事例において，通常の比較では見えなかった不一致が多く検出された事例もあった。
- 昨年度開発した迅速簡便なふき取りからのウイルス検出法に食品添加物に指定されている Tween20 を用いることで一定のウイルス回収率が得られた。
- カキからのノロウイルス検出法として開発したアセトン処理法における添加するアセトンおよびアミラーゼの量の至適化を行った。
- 下水，患者，カキ等の二枚貝，施設拭き取り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みられた。臨床検体と下水検体から検出される遺伝子型にも関連性がみられた。
- 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。
- 市販生食用カキから未分類のノロウイルス GI が検出された。
- 2016/17シーズンに流行したノロウイルスはGII.2，GII.17，GII.4などが多い傾向にあった。
- 食品や施設の拭き取りからのウイルス検出およびその塩基配列の比較が広域食中毒事件の調査に大きく寄与した。

- ふき取り検出期間に関する検討では，1ヶ月後の検体でも遺伝子が検出された。
- 食中毒事例において，無症状の調理従事者の中に約12%の不顕性感染者が認められた。
- 2014/15シーズン，2015/16シーズンに多発したGII.17，2016/17シーズンに多発したGII.2は，集団発生が起こる約3か月前から流入下水から検出された。
- 特定の細胞/コール酸の培養系でヒトサポウイルスにおいて培養上清中にウイルスRNAシグナルの増加およびコピー数の経時的増加を認めた。分離の成否に接種材料の調整法が関与している可能性が示唆された。
- 3種類の腸管系細胞株について，胆汁成分などの至適添加量を決定した。

2. 調理従事者からの二次汚染防止に関する研究

- CMC液による手指のコーティング法は水やハンドソープを用いた手洗いと比較して，手に残存するファージの量を1/10にすることが確認された。
- ヒトノロウイルス不活性化評価にかかる代替ウイルスの選定およびその方法について検討し，今回3種類のウイルス(ネコカリシウイルスF9株，ネコカリシウイルスym3株およびコクサッキーA6型ウイルス)をその候補として決定した。
- コクサッキーB5型ウイルスはエタノールに対し高感受性であり，エタノール系消毒剤の評価ではノロウイルスの代替ウイルスとしては不適切であることが示された。
- ネコカリシウイルスおよびマウスノロウイルスを用いて，天然生理活性物質120化合物について抗ノロウイルス活性の評価を行ったところ，14化合物が抗ウイルス活性を示した。しかし両ウイルスに効果を示す化合物はみつからなかった。
- 健康管理において，ノロウイルス感染に比較的共通に認められる症状である胃部の異常，便性状の変化，倦怠感などを把握することがノロウイルス感染者の把握に重要である。
- ノロウイルスに感染した従事者がトイレで排便した場合，作業着の汚染を介して食品取扱室にウイルスを持ち込む可能性が示唆された。手袋を着用してのトイレの利用は，作業着等への汚染防止の手段として有用であった。
- 2017年1月から2月に発生した刻み海苔関連食中毒事件において，和歌山県御坊市での事例では一人が6,250コピーのノロウイルスを摂取したと推定された。海苔の刻み作業を行った感染者の便中のウイルス量は，約10^9/gであったと推定された。

F. 健康危害情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Hiroko Sato, Chihiro Shibata, Yoko Fujiya, Wakako Akino and Saito H: Epidemiology of scrub typhus in

Akita Prefecture, 2007-2016. Infectious Agents Surveillance Report, 38 (6), 5-6 (2017)

- Hiroyuki Saito, Wakako Akino, Hiroko Sato, Yoko Fujiya, Chihiro Shibata, Ryoetsu Sato and Hiroyuki Shimizu: Isolation of enterovirus D68 using suckling mice. Infectious Agents Surveillance Report, 38 (10), 11-12 (2017)
- Imamura S, Kanezashi H, Goshima T, Haruna M, Okada T, Inagaki N, Uema M, Noda M, Akimoto K. (2017)Next-Generation Sequencing Analysis of the Diversity of Human Noroviruses in Japanese Oysters., Foodborne Pathog Dis., Jun 8. doi: 10.1089/fpd.2017.2289.
- Imamura S, Kanezashi H, Goshima T, Suto A, Ueki Y, Sugawara N, Ito H, Zou B, Uema M, Noda M, Akimoto K. (2017)Effect of High-Pressure Processing on Human Noroviruses in Laboratory-Contaminated Oysters by Bio-Accumulation., Foodborne Pathog Dis., Jun 8. doi: 10.1089/fpd.2017.2294.
- 宗村佳子，木本佳那，小田真悠子，永野美由紀，奥津雄太，森功次，秋場哲哉，貞升健志：拭き取り検体からのノロウイルス遺伝子検出状況. 食品衛生学雑誌，58(4)，201-204(2017)
- 宗村 佳子，木本 佳那，小田 真悠子，奥津 雄太，加藤 玲，鈴木 康規，齊木 大，平井 昭彦，秋場 哲哉，新開 敬行，貞升 健志：学校給食で提供された刻みのりによるノロウイルス食中毒. 食品衛生学雑誌，58(6)，260-267(2017)
- 上間匡，野田衛 (2017)ノロウイルスによる食中毒，公衆衛生，81(6)：
- 入谷展弘，上林大起，改田厚，阿部仁一郎，山元誠司，久保英幸，平井有紀，野田衛，小笠原準： 2016－2017 シーズンに大阪市で認められたノロウイルス流行，大阪市立環境科学研究所報告　調査・研究年報　79，1-4 (2017)
- 野田衛 (2017)改訂新版　ノロウイルス食中毒・感染症からまもる!!-その知識と対策-，公益社団法人日本食品衛生協会，1-156
- 野田衛 (2017)刻み海苔を介したノロウイルス食中毒事件が教えてくれたこと，国立医薬品食品衛生研究所報告，135,6-12
- 野田衛 (2017)本邦初の刻み海苔を介した分散型広域ノロウイルス食中毒事件の全体像，食品衛生研究，67.7-14

2. 学会発表

- Hiroyuki Saito, Yuko Shimizu, Hiroko Sato, Wakako Akino, Satoshi Hayakawa and Hiroshi Usijima : Immunological response in a patient of noroviruses infection associated with raw oyster. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会，2017，大阪
- 永田文宏，上間匡，濱島洋介，寺杣

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

- 今村彩貴，金指大海，五島朋子，須藤篤史, 植木洋, 菅原直子, 伊藤　博，鄒碧珍，上間匡，野田衛，秋元京子(2017)高圧処理によるノロウイルス人為汚染カキの汚染低減効果，第 38 回日本食品微生物学会学術総会，徳島市，10/5
- 今村彩貴，金指大海，五島朋子，須藤篤史，植木　洋，菅原直子，伊藤博，鄒　碧珍，上間　匡，野田衛，秋元京子 (2017)高圧処理による養殖カキ中のノロウイルス汚染低減効果，第 113 回日本食品衛生学会学術講演会，江東区，11/9
- 斎藤博之，佐藤寛子，早川智，牛島廣治：生カキ喫食後の胃腸炎症例におけるノロウイルス排泄状況と免疫応答, 第 58 回日本臨床ウイルス学会，2017，長崎
- 斎藤博之，秋野和華子，佐藤寛子，清水優子，早川　智，牛島廣治，野田衛（2017)ノロウイルス GII.17 に対するパンソルビントラップ・トラップ法の有効性に関する検討，第 113 回日本食品衛生学会学術講演会，江東区，11/9
- 斎藤博之，秋野和華子，佐藤寛子，清水優子，早川智，牛島廣治，野田衛：ノロウイルス GII.17 に対するパンソルビン・トラップ法の有効性に関する検討，第 113 回日本食品衛生学会学術講演会，2017，東京
- 斎藤博之，秋野和華子，佐藤寛子，清水優子，早川智，牛島廣治，野田衛：パンソルビン・トラップ法の捕捉抗体供給源としてのガンマグロブリンの再評価，第 38 回日本食品微生物学会学術総会，2017，徳島
- 斎藤博之，秋野和華子，佐藤寛子，清水優子，早川智，牛島廣治，野田衛：生カキが原因でノロウイルスに感染した症例におけるノロウイルス排泄状況と抗体価の推移，第 29 回秋田応用生命科学研究会講演会，2017，秋田
- 宗村佳子:ノロウイルス食中毒－刻み海苔を原因とした大規模な即中毒事例を踏まえ－．第 113 回食品衛生学会学術講演会，東京，2017 年 11 月 10 日
- 秋野和華子，斎藤博之，野田衛：市販生カキにおけるノロウイルス汚染の定量的調査，第 38 回日本食品微生物学会学術総会，2017，徳島
- 小林孝行, 吉冨秀亮, 中村麻子, 芦塚由紀, 梶原淳睦, 野田衛：福岡県内で発生したノロウイルス ＧⅠ.Pc-ＧⅠ.5 による食中毒事例について, 第 43 回九州衛生環境技術協議会, 北九州市, 10 月 12 日, 2017
- 小林孝行, 吉冨秀亮, 中村麻子, 芦塚由紀, 梶原淳睦, 野田衛：福岡県内の食中毒事例から検出されたノロウイルス ＧⅠ.Pc-ＧⅠ.5 の遺伝子解析, 第 38 回日本食品微生物学会, 徳島県, 10 月 5 日, 2017
- 小林孝行，吉富秀亮，中村麻子，芦塚由紀，梶原淳睦，野田　衛（2017）

福岡県内の食中毒事例から検出されたノロウイルスGI.Pc-GI.5の遺伝子解析，第38回日本食品衛生学会学術総会，徳島市，10/5

- 上間匡，永田文宏，野田衛（2017)糞便汚染指標としての Pepper mild mottle virus の評価，第113回日本食品衛生学会学術講演会，江東区，11/9
- 谷澤由枝，重本直樹，高尾信一，野田衛：ふき取り検体からのノロウイルス検出法の改良及び公共施設トイレにおけるノロウイルスのモニタリング，第38回日本食品微生物学会学術総会，2017，徳島
- 中村麻子,吉冨秀亮,小林孝行,芦塚由紀,梶原淳睦,野田衛：市販ノロウイルス検出イムノクロマトキットの遺伝子型別反応性評価,第 64 回福岡県公衆衛生学会,福岡市,5 月 18 日,2017
- 入谷展弘，上林大起，改田厚，阿部仁一郎，山元誠司，久保英幸，野田衛:2016/17シーズンに大阪市で認められたノロウイルス GII.2 流行，第65回日本ウイルス学会，大阪(2017.10.24-26)
- 髙木弘隆，永田文宏，上間匡，野田衛（2017)食品媒介性及び介在性ウイルスに関する不活性化評価手法の策定に向けた検討(1)－ヒトノロウイルス代替ウイルス選定に関する検討，第38回日本食品微生物学会学術総会，徳島市，10/5

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

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

研究分担者　　髙木　弘隆　　国立感染症研究所
バイオセーフティ管理室

研究要旨

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

A. 研究目的

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

B. 研究方法

1. 材料

a) ウイルス

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

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

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

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

d)使用薬剤
①NaClO (原液有効塩素 5%)
②エタノール(EtOH 99.5%)
③過酸化水素(H_2O_2、原液 30%)
④炭酸ナトリウム(Na_2CO_3、0.5-1%)
①は花王株式会社製、②～④和光純薬製のものを精製水にて適宜希釈して供試した。

e)中和用培地：
①ClO 用：20mM $Na_2S_2O_3$ 含有各使用培地
②H_2O_2 用：20 μg/ml Catalase 含有各使用培地
③炭酸 Na 用：重炭酸 Na 不含、10mM HEPES 含有各使用培地

2. 方法 1. エタノール製剤による供試ウイルス不活性化の比較検討

自家調整エタノールは混合時の終濃度が 60%あるいは 80%となるよう調製する(実濃度は 66.7%あるいは 88.9%)。供試ウイルス①~③について、エタノール製剤:ウイルス液の混合比を 9:1 とし、マイクロチューブ内にて混合・反応を開始した。反応後 15～最長 300 秒まで経時的に採取し、ただちに各培地にて 7 倍希釈し反応を停止(これを $^{7-1}$ と)する。

希釈用 96well-microplate にて 7 倍段階希釈系(7^{-2}～7^{-8})を作成し、これを予め用意した培養細胞 96well-microplate に 50 μl/well で接種した。36℃・5%CO_2 にて 4～6 日間培養後、10%ホルマリン-PBS(-)で一晩固定し、固定液を捨て methylene-blue にて染色後に CPE 観察により感染価を算出(Behrens-karber 法)した。

方法 2. 炭酸ナトリウム(Na_2CO_3)および過酸化水素(H_2O_2)の各溶液によるウイルス不活性化の比較検討

Na_2CO_3 は 0.5-1%溶液(1%=約 0.1M)を、H_2O_2 については 30%原液を希釈し、0.5～2%液を調製した。供試ウイルス②及び③と各調製液の混合比を Na_2CO_3、H_2O_2 共に 1:9 とし、マイクロチューブ内にて混合・反応を開始した。反応は最大 60 分までとし、反応液を経時的に採取し、ただちに中和用培地液②あるいは③にて 7 倍希釈し反応を停止(これを $^{7-1}$ と)した。

期借用 96well-microplate にて 7 倍段階希釈系(7^{-2}～7^{-8})を作成し、これを予め用意した培養細胞 96well-microplate に 50 μl/well で接種した。36℃・5%CO_2 にて 4～6 日間培養後、10%ホルマリン-PBS(-)で一晩固定し、固定液を捨て methylene-blue にて染色後に CPE 観察により感染価を算出(Behrens-karber 法)した。

方法 3. Human coxsackievirus(hCox-A、-B)による各種薬剤での不活性化比較検討

これまで hNoV 代替として検討してきた enterovirus を補完するものとして、NaClO に対して抵抗性を示す hCox-A および hCox-B が候補に挙げられたため、当所ウイルス第 2 部より 3 株を分与いただき、これらについて、定法に従って NaClO、エタノール(終濃度 80%)の不活性化効果を検討した。加えて hCox-A6 については 1%Na_2CO_3 および 2%H_2O_2(反応比 1:9)の不活性化効果についても、定法に従い検討した。

(倫理面への配慮)

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

C. 研究結果

結果 1. エタノール製剤によるウイルス不活性化について

FCV-ym3 株では FCV において EtOH の不活性化効果が最も高くなる 60%濃度においても、感染価減衰は反応 2 分以降ほぼ横ばいとなり 5 分後でも $3log_{10}TCID_{50}$ の減衰に留まった(Fig.1)。これに対し、EV71 および hPeV-1 ではほぼ直線的に感染価減衰が起こり、EV71 では 4～5 分で、hPeV では約 5 分で $4log1_0TCID_{50}$ の感染価減衰に至った(Fig.2 および 3)。

結果 2. Na_2CO_3 および H_2O_2 の各溶液によるウイルス不活性化について

1%Na_2CO_3 による不活性化について、EV71 では反応 10 分までに急激に感染価が減衰し、反応 20 分後には検出限界($4log_{10}TCID_{50}$ 以上の減衰)となった(Fig.4)。HPeV-1 では反応 60 分後まで感染価減衰は全く起こらなかった(Fig.5)。

H_2O_2 による不活性化については、EV71 では 1%以上で反応 20 分以降からわずかに感染価が減衰するに留まった(Fig.6)。hPeV-1 では 0.5%から感染価減衰が認められ、1%で反応 40 分後、2%で反応 20 分後に $4log_{10}TCID_{50}$ 以上の感染価減衰に至った (Fig.7) 。参考までに FCV-ym3 の 2%H_2O_2(反応比 1:4)による感染価減衰を Fig.8 に示す。

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

最初に NaClO 150ppm での hCox-A6 と hCox-B5 の不活性化効果について検討したところ、hCox-A6 で若干の抵抗性が認められた(Fig.9)。次にエタノール終濃度 80%での hCox3 種類の不活性化効果を比較したところ、hCox-B3 および B5 は反応 20 秒で $4log_{10}TCID_{50}$ 以上感染価が減衰したが、hCox-A6 は反応 5 分後でも $2log_{10}TCID_{50}$ 以内の減衰のとどまった(Fig.10)。

これらの結果より hCox-B2 種は候補より外し、hCox-A6 の各種製剤による不活性化を確認したところ、NaClO については 50-100ppm では FCV-ym3 同様に反応 5 分でも全く感染価は減衰せず、200ppm でも反応 1 分後でわずかな感染価残存が認められた(Fig.11)。2%H_2O_2 では反応 60 分でも感染価は減衰せず(Fig.12)、1%Na_2CO_3 では反応 5 分以降でほぼ直線的な感染価減衰がみられ、40 分以降で $4log_{10}TCID_{50}$ 以上の減衰に至った(Fig.13)

D. 考察

代替候補ウイルスによる 4 種類の製剤を用いた不活性化効果について、前年度及び今年度のデータを表にまとめてみると(Table.1)、これまで汎用されてきた FCV-F9 に対して、供試製剤により抵抗的なものは FCV-ym3 と hCox-A6 であった。ノロウイルスと同属であるということで、汎用されてきたマウスノロウイルス(MNV)については各種製剤すべてに高い感受性を示している。またこれまで FCV-ym3 及び MNV は Na_2CO_3 に対して抵抗性であるとしてきたが、その後のデータ解析の結果、1 次線形解析が可能であり、各々高い感受性を有することが示唆された(追補データ参照)。

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

評価ガイドラインに使用する代替ウイルスは、これまでの不活性化に関する報告実績も鑑み、基準株として FCV-F9、「相乗効果」を狙った合剤など評価用として FCV-ym3 及び hCox-A6 の 3 種類とすることを考えている。今後この 3 種類により評価手法およびその妥当性や再現性について検証を行う。

E. 結論

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

【謝辞】

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

F. 研究発表

1. 論文発表　なし
2. 学会発表

・食品媒介性ウイルス及び介在性ウイルスに関する不活性化評価手法の策定に向けた検討(1)　第 38 回日本食品微生物学会学術総会　2017 年 10 月　徳島

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

Fig.1)

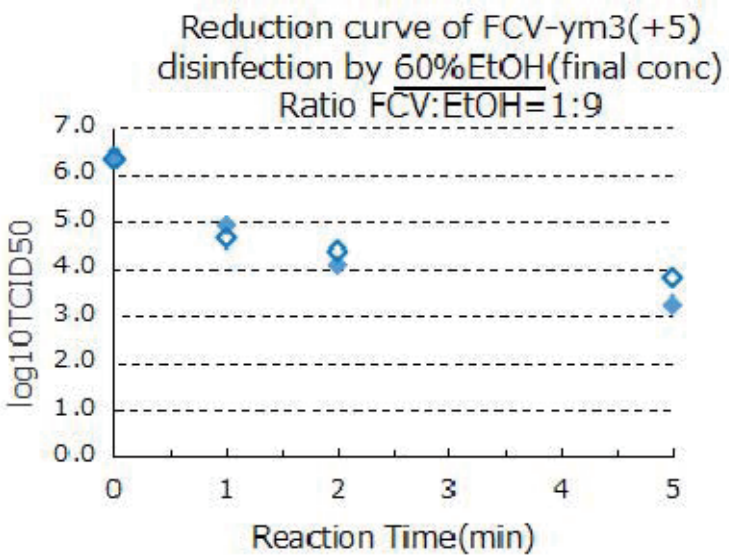


Fig.2)

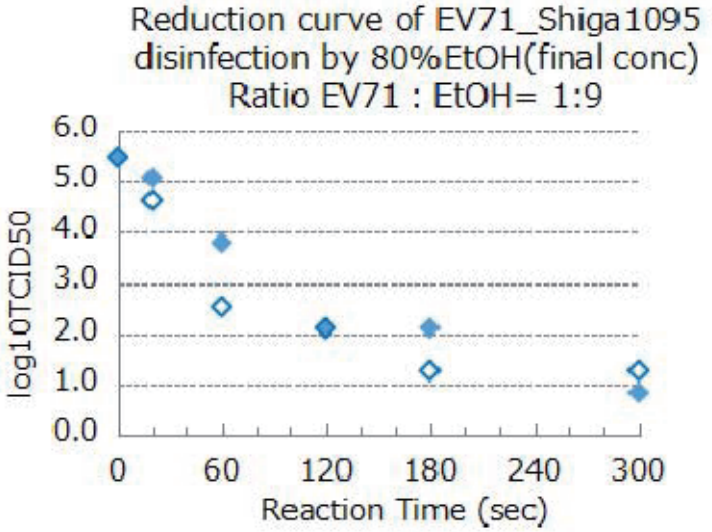


Fig.3)

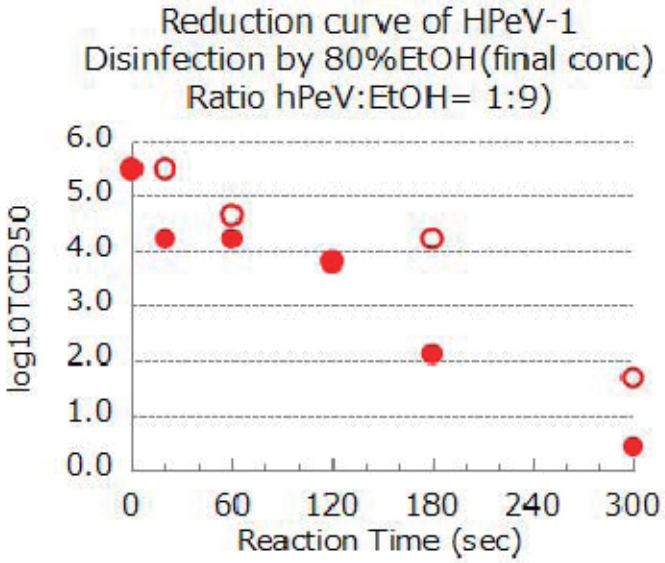


Fig.4)

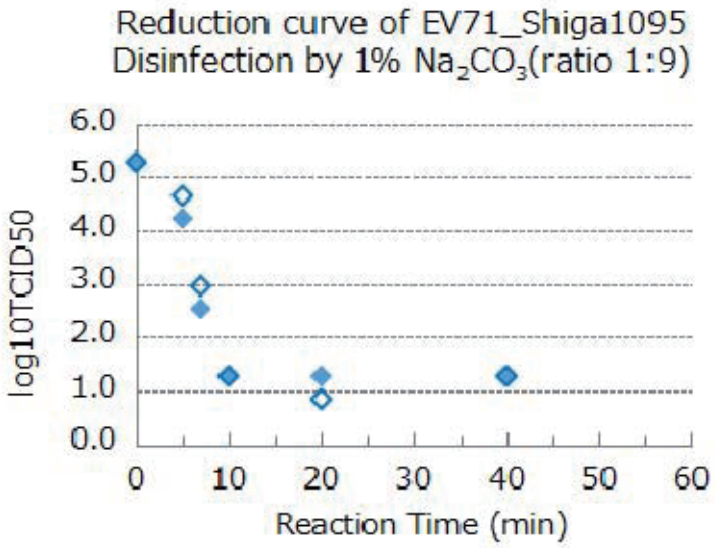

Reduction curve of EV71_Shiga1095
Disinfection by 1% Na2CO3(ratio 1:9)
log10TCID50
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
0
10
20
30
40
50
60
Reaction Time (min)

Fig.5)

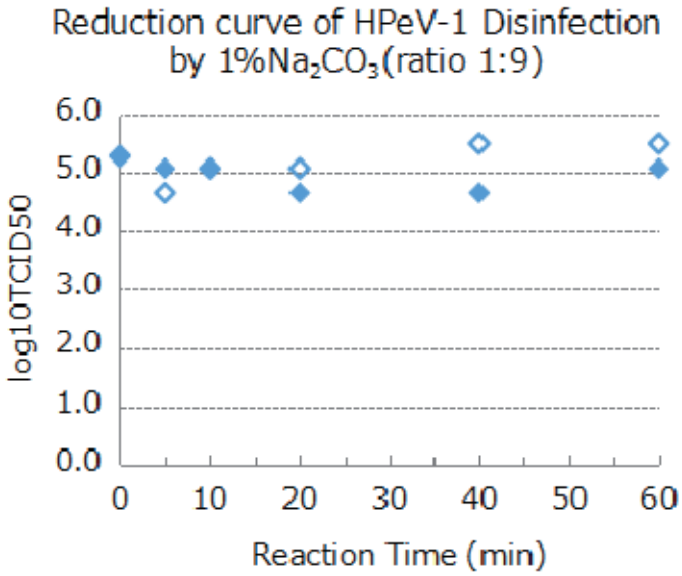

Reduction curve of HPeV-1 Disinfection
by 1%Na2CO3(ratio 1:9)
log10TCID50
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
0
10
20
30
40
50
60
Reaction Time (min)

Fig.6)

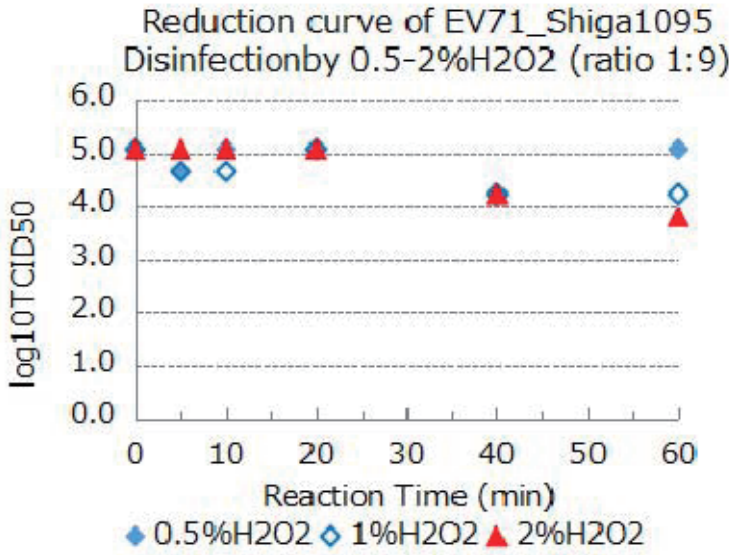


Fig.7)

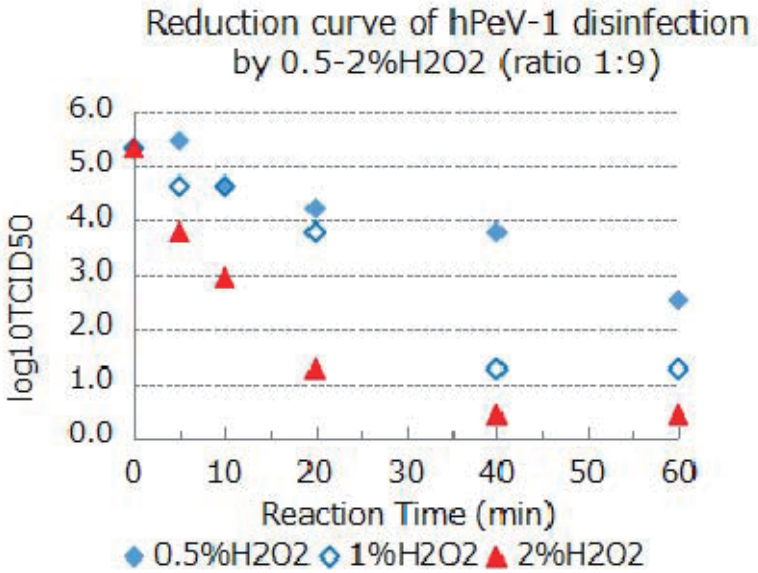


Fig.8)

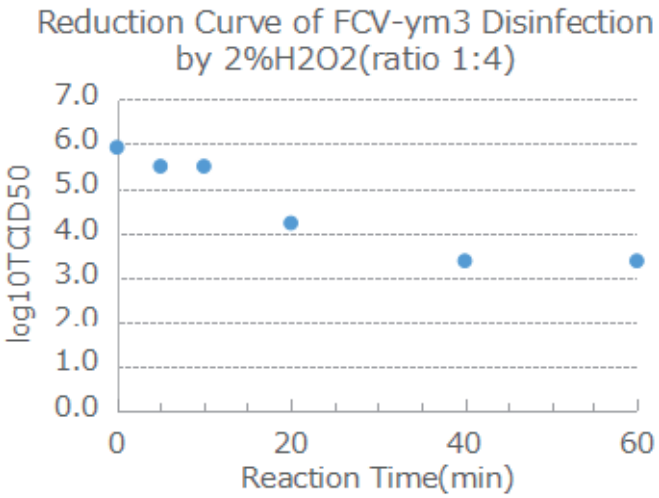


Fig.9)

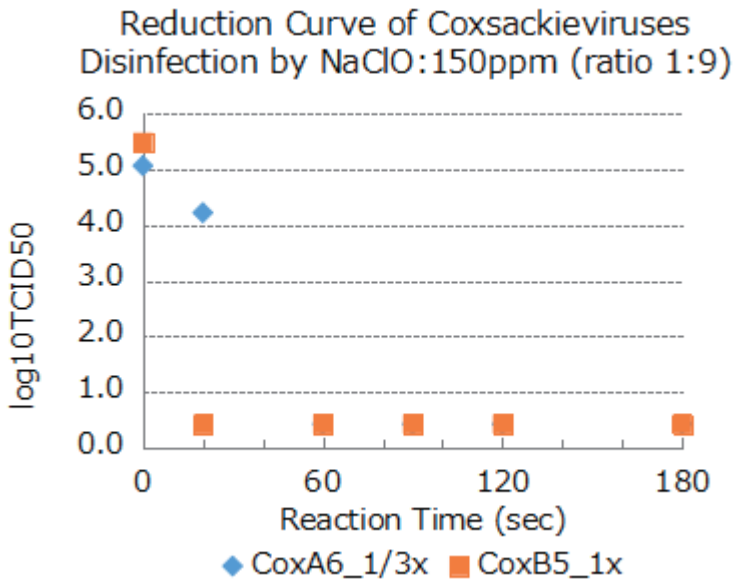

Reduction Curve of Coxsackieviruses
Disinfection by NaClO:150ppm (ratio 1:9)
log10TCID50
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
0
60
120
180
Reaction Time (sec)
CoxA6_1/3x
CoxB5_1x

Fig.10)

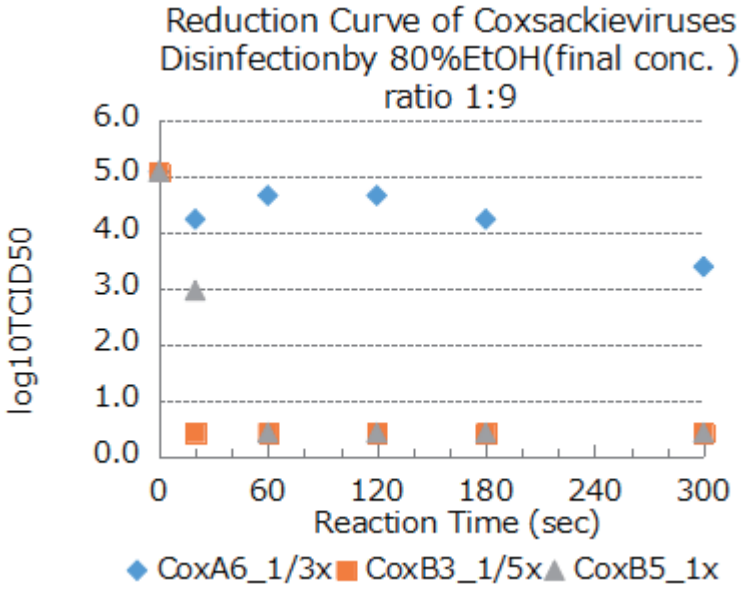

Reduction Curve of Coxsackieviruses
Disinfectionby 80%EtOH(final conc.)
ratio 1:9
log10TCID50
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
0
60
120
180
240
300
Reaction Time (sec)
CoxA6_1/3x
CoxB3_1/5x
CoxB5_1x

Fig.11)

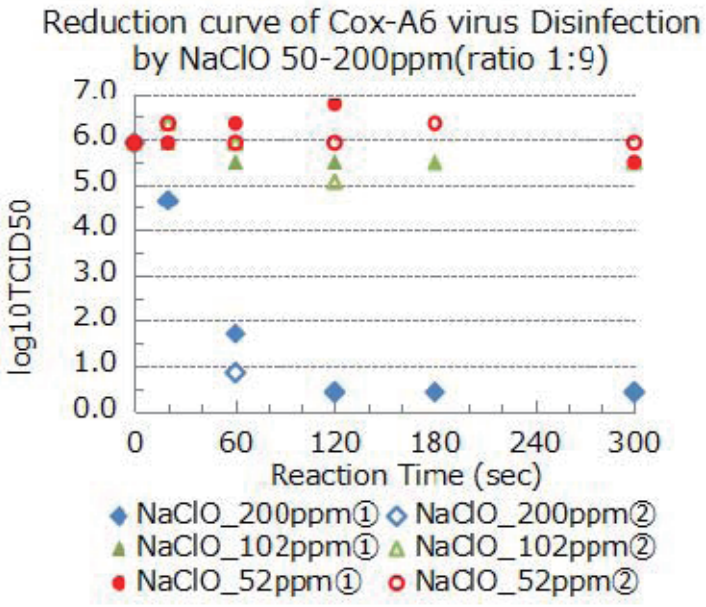


Fig.12)

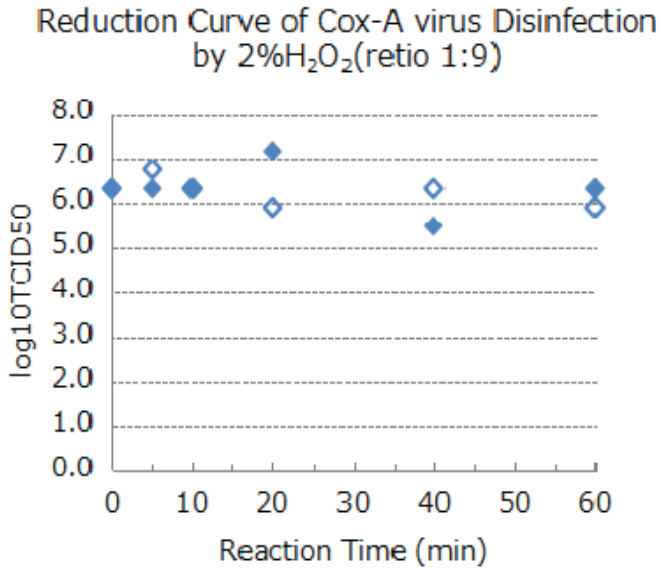
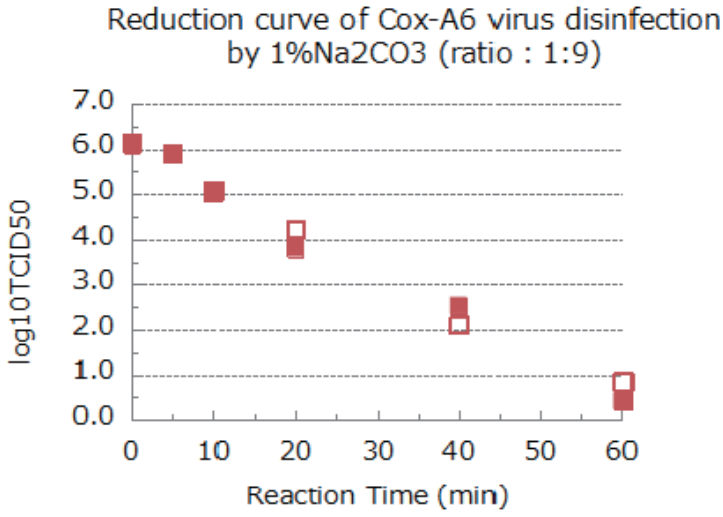


Fig.13)

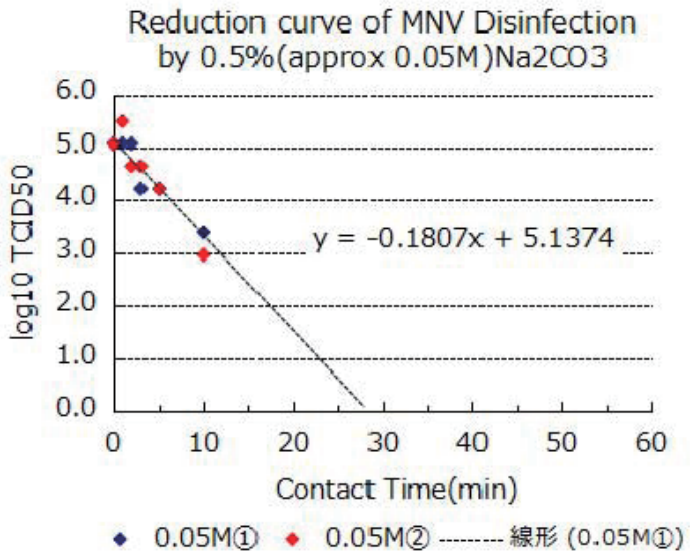


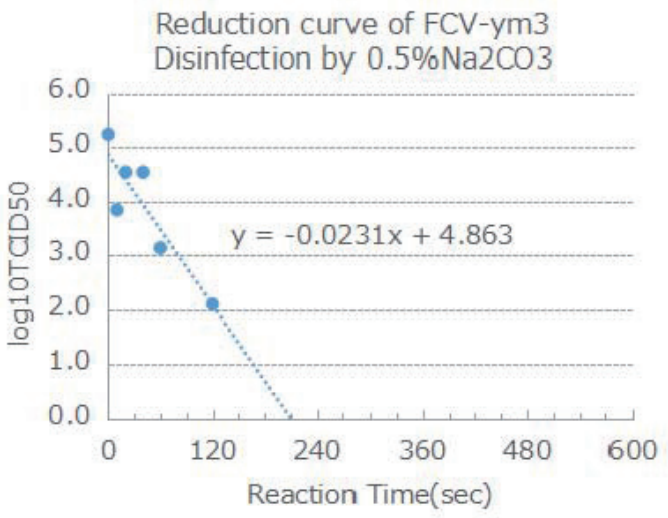
	NaClO	Ethanol	H_2O_2	Na_2CO_3
FCV-F9	100ppm 20sec	F50% 5min	2% ~60min	0.5% ～1min
FCV-ym3	200ppm 20sec	F60% **LE**	2% **LE**	0.5% ～3min
MNV-S7	100ppm 60sec	F50% 40sec	0.5% ～60min	0.5% 25-30min
hPeV-1	100ppm 40-60sec	F80% ～5min	1% ～40min	1% **LE**
EV71	100ppm 20sec	F80% 4-5min	2% **LE**	1% 10-20min
hCox-A6	200ppm 60sec	F80% **LE**	2% **LE**	1% ≧40min

Table.1)

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

《追補データ》





平成 29 年度厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)
「ウイルスを原因とする食品媒介性疾患の制御に関する研究」
研究分担報告

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

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

研究要旨

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

A.　研究目的

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

B.　研究方法

1.　材料

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

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

・培地：
　クラシカル培地より自家変法調製した。

・コール酸類：
　胆汁末を含めた 5-6 種類を各培養細胞に合わせて調製した。

・RNA 抽出：
　Roche High Pure Total RNA isolation kit

・RT kit：
　ReverTra Ace®(TOYOBO)

・PCR kit：
　KAPA2G Fast-HS(KAPA Bioscience)

・Real-time RT-PCR：
　Oka らの手技による [2), 3)]

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

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

3. 方法 2　培養上清からの RNA 抽出・RT-PCR

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

この cDNA を template として 2 μl、forward・reverse primer10 μM を各 1 μl、KAPA2G Fast-HS 2×mix を含む反応液 20 μl を調製した。これをまず 95℃・3 分で変成させ、95℃・20 秒、52℃・20 秒、72℃・5 秒の反応を 35 回繰り返し、最後に 72℃・2 分の伸長反応を行った。PCR 産物を 2.3%agarose gel に 7 μl/lane で接種し、電気泳動を行って geno-specific product の確認とシグナル強度を確認した。使用した primer set は別表に示した [4), 5)]。

4. 方法 3　接種材料のウイルス RNA 保存性チェック

サポウイルスは IC キットなどの簡易検査キットが存在しないため、陽性検体中のウイルス粒子の存在状況について接種前に確認するための暫定的な方法として、前記方法 2 のうち、cDNA 合成過程において、pdT_{30}_primer を使用し、ウイルス RNA の 3'end から cDNA 合成を行い、その後方法 2 と同様の PCR・agarose 電気泳動により、その保存性をチェックすることとした。

(倫理面への配慮)

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、また検体はすべてコード化され、個人情報との連結は絶たれている。同時に今回年齢・性別・地域といった個人特定につながる情報は一切必要としない。

C. 研究結果

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

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

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

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

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

D. 考察

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

ている。

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

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

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

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

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

E. 結論

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

【謝辞】

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

参考文献>>

1)Chang, et al, PNAS vol.101 NO.23 8733-8738

2)Oka et al, J Med Virology 2006 Oct; 78(10):1347-53

3)食品衛生検査指針 微生物編 2015 年版

4)Okada, et al, Arch virol(2006) 151: 2503-2509

5)Kitajima, et al, APPL.Environ.Microbiol, Apr. 2010, p 2461-2467

F. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

平成 29 年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
「ウイルスを原因とする食品媒介性疾患の制御に関する研究」
研究分担報告書

パンソルビンの品質に関する課題への対応

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

研究要旨

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。原材料であるブ菌はホルマリン固定された製品（パンソルビン）として流通しているが、2015 年以降に購入したロットについて固定の程度が弱くなっていることが判明した。このことは、本法の操作過程でブ菌の核酸成分の漏出を招き、ウイルスの回収率を低下させることから看過し得ない問題となった。パンソルビンの出荷基準は、一定量以上の IgG を吸着できるかどうかであり、核酸漏出については規定されていない。製品としては正常であることから、メーカー側に対応を求めることは困難であり、使用者側で問題解決を図る必要が生じた。本研究では、パンソルビンからブ菌由来核酸の漏出が起こらないように再固定プロトコールを考案した。再固定を行うことで、問題発生前に購入したパンソルビンと同等以上の回収率が得られるようになった。再固定はパンソルビンを購入後に 1 回だけ行えばよく、以後は長期保存してこれまでどおり使用できることから、試験検査機関における負荷も最小限で済ませられるものと考えられた。

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やアデノウイルス 41 型に代表される腸管系アデノウイルスも含まれている。さらに、近年では輸入食品等が原因と考えられる A 型肝炎ウイルスや、野生動物に由来する E 型肝炎ウイルス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、本法の普及と合わせてパンソルビンの生産ラインが急拡大したこともあり、近年になってホルマリン固定の程度の弱い製品が販売されていることが判明した。今年度は、その対策に関する検討を行った。

B. 研究方法

1. 研究材料

市場供給されているパンソルビン(メルク社)を検討するに当たり、2014 年購入品(ロットNo.: D00160008)、2015年購入品(ロットNo.: D00173442)、2016 年購入品(ロットNo.: 2706036)、2017 年購入品(ロットNo.: 2799115)を用いた。また、検出対象となるウイルスとして、NoV GII.4 (AB293424)を含む糞便を用いた。

2. 試薬類

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

2) 5%ガンマグロブリン製剤
米国 HDM Labs Inc 社の試薬用 5%ガンマグロブリン製剤を用いた。Advy Japan 社から購入した。

3) フェノール系 RNA 抽出キット
TRIzol-LS (Thermo Fischer Scientific) を使用した。

4) カラム方式の RNA 抽出キット
QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) を使用した。

5) 再懸濁液
4)の抽出キット添付の AVL 液を用いた。

6) 逆転写酵素
ReverTraAce(東洋紡)を使用した。

7) 逆転写反応に用いたプライマー
PANR-G2 (Food Environ. Virol., **7**, 239-248, 2015)を用いた。

8) Real-time PCR 装置
ロシュ社製「LightCycler320S」を用いた。

9) 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。

10) Real-time PCR 反応系
Kageyama らの方法 (J. Clin. Microbiol., **41**, 1548-1557, 2003) に従った。

11) 再固定処理用緩衝液
洗浄用に PBS(-)、固定用に 1.5%ホルマリン/PBS(-)、保存用に 0.1%アジ化ナトリウム/PBS(-)を用いた。

3. パントラ法の手順
平成 22 年度に完成した汎用プロトコル(図 1)に従った。α-Amylase 添加とオンカラム DNase I 処理は今回の検討では不必要のため省略した。

4. NoV GII.17 の回収率に関する検討
食品洗滌液 50mL 中に 1.45×10^5 コピーの NoV GII.4 を添加し、ガンマグロブリンを捕捉抗体としたパントラ法による回収率を検討した。この際、TRIzol-LS /クロロホルム抽出後における検体の状態を観察した。

5. パンソルビンの再固定

図 6 の手順によりパンソルビンの再固定を行った（詳細は末尾マニュアル参照）。再固定したパンソルビンについて、4 と同様に回収率を比較した。

（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. パンソルビンのロットによる回収率の違い

図 2 に示すとおり、TRIzol-LS /クロロホルム抽出後の検体の状態を比較すると、遠心直後は水層・中間層・有機層に分かれてロット差は認められなかった。しかし、水層に 0.8 倍量のエタノールを添加した段階で、2015 年以降に購入したパンソルビンでは白濁が生じた。さらに、これを遠心することで沈澱が確認された。

Real-time PCR で NoV の遺伝子を増幅したところ、2014 年に購入したパンソルビンと比較して、2015 年に購入したそれは明らかに効率が低下していた（図 3）。特にエタノール添加時の白濁を遠心除去した場合には、全く検出できなくなった。

2. 再固定の効果に関する検討

1.において問題が生じた 2015 年購入のパンソルビンを図 6 の手順に従って再固定したところ、抽出工程における白濁が起こらなくなり（図 7）、増幅曲線も改善された（図 8）。回収率は 2014 年購入分と同等以上になった（表 1）。

D. 考察

1. パンソルビンのロット差について

本法の開発がスタートしたのは 2007 年であり、2014 年まではパンソルビンに不都合は認められなかった。しかし、2015 年以降に購入したパンソルビンは、操作中に黄色ブドウ球菌（ブ菌）の成分に由来した白濁・沈澱が生じる等の問題が発生した（図 2）。RNA 抽出キットの説明書（図 4）には、「沈殿物が生じた場合は再懸濁して操作を進める」と書かれているが、それに従っても NoV 検出系における悪影響は排除できなかった（図 3）。この問題は、本法の普及に伴って生産サインが拡大したことと無関係ではないと推察される。一方、パンソルビンの試薬そのものは、PCR 登場以前から蛋白質の免疫沈降法のために用いられており、出荷基準は図 5 に示したとおり、試薬 1mL 当たりヒト IgG を 2mg 以上結合するというものである。従って、固定の程度が弱まり、原材料であるブ菌の核酸成分が漏出・沈澱することは想定されていない。製品としては正常である（不良品ではない）ことから、メーカー側に対応を求めることは困難である。以上のことから、この問題を解決するためには、パンソルビンを購入後にホルマリンを用いて再固定するのが現実的であると考えられた。

2. 再固定の効果について

抽出工程において白濁が生じていたパンソルビンを再固定したところ、図 7、図 8、及び表 1 に示したとおり、問題は解決された。また、本研究では白濁の原因が生産過程における固定不足であることを想定したが、結果としてそのことが証明されたことになる。再固定はパンソルビン購入後に 1 回だけ行えばよく、以後は 0.1%アジ化ナトリウム添加

PBS(-)に懸濁して保存しておくことで、これまでどおり使用できる。固定後 10 ヶ月後に使用した場合でも回収率に変化は認められなかったことから、保存性に問題はないと考えられる。再固定には高速冷却遠心機を用いるが、多くの試験検査機関では常備されているものであり、実施における負荷は最小限に抑えられている。

3. 補遺

今回の問題は、RNA 抽出キットとして、QIAamp Viral RNA Mini Kit を用いた場合に発生したものであって、操作中のエタノール添加を要しないキットでは顕現しない可能性がある。エタノールを用いない核酸自動抽出機「MagNA Pure LC（ロシュ）」を用いている機関からは、特段の問題はないという情報を得ている。

4. まとめと今後の課題

パントラ法の根幹となる試薬であるパンソルビンは、ブ菌を原材料としてホルマリン固定したものであるが、従前は蛋白質の免疫沈降法に用いられていたことから、出荷基準として核酸の漏出は想定されていなかった。近年、市場で流通している製品は、蛋白質の分析に用いる際には問題ないが、PCR 等の核酸分析の場合には、漏出したブ菌の核酸成分のために不具合をきたすことが判明した。この問題を解決するために、再固定プロトコールを考案した。実際に再固定を行ったところ、問題発生以前に購入したパンソルビンと同等以上の回収率となった。次年度以降の研究課題については、再固定したパンソルビンを用いることで安定したデータが得られるものと期待される。また、本法はすでに多くの機関で食中毒検査に用いられていることから、再固定マニュアルについて「食品衛生検査指針・微生物編 2015 年版（第 2 版）」に記述し、「http://www.nihs.go.jp/fhm/csvdf/sttest/fixing_of_pansorbin.pdf」よりダウンロードできるように手配した。

今後の課題として、ウイルスの回収効率を客観的に評価する必要性が生じてくることから、内部標準物質の使用について検討を進める必要がある。また、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う。そのため、サンプリングプランや、スケールアップの方法についても検討する余地が残されている。

E. 結論

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

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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

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

2. 学会発表

1) 斎藤博之、秋野和華子、佐藤寛子、清水優子、早川智、牛島廣治、野田衛:生カキが原因でノロウイルスに感染した症例におけるノロウイルス排泄状況と抗体価の推移、第 29 回秋田応用生命科学研究会講演会、2017、秋田

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

3) 斎藤博之、秋野和華子、佐藤寛子、清水優子、早川智、牛島廣治、野田衛:パンソルビン・トラップ法の捕捉抗体供給源としてのガンマグロブリンの再評価、第 38 回日本食品微生物学会学術総会、2017、徳島

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

5) Hiroyuki Saito, Yuko Shimizu, Hiroko Sato, Wakako Akino, Satoshi Hayakawa and Hiroshi Usijima : Immunological response in a patient of noroviruses infection associated with raw oyster. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会、2017、大阪

6) 斎藤博之、秋野和華子、佐藤寛子、清水優子、早川智、牛島廣治、野田衛:ノロウイルス GII.17 に対するパンソルビン・トラップ法の有効性に関する検討、第 113 回日本食品衛生学会学術講演会、2017、東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

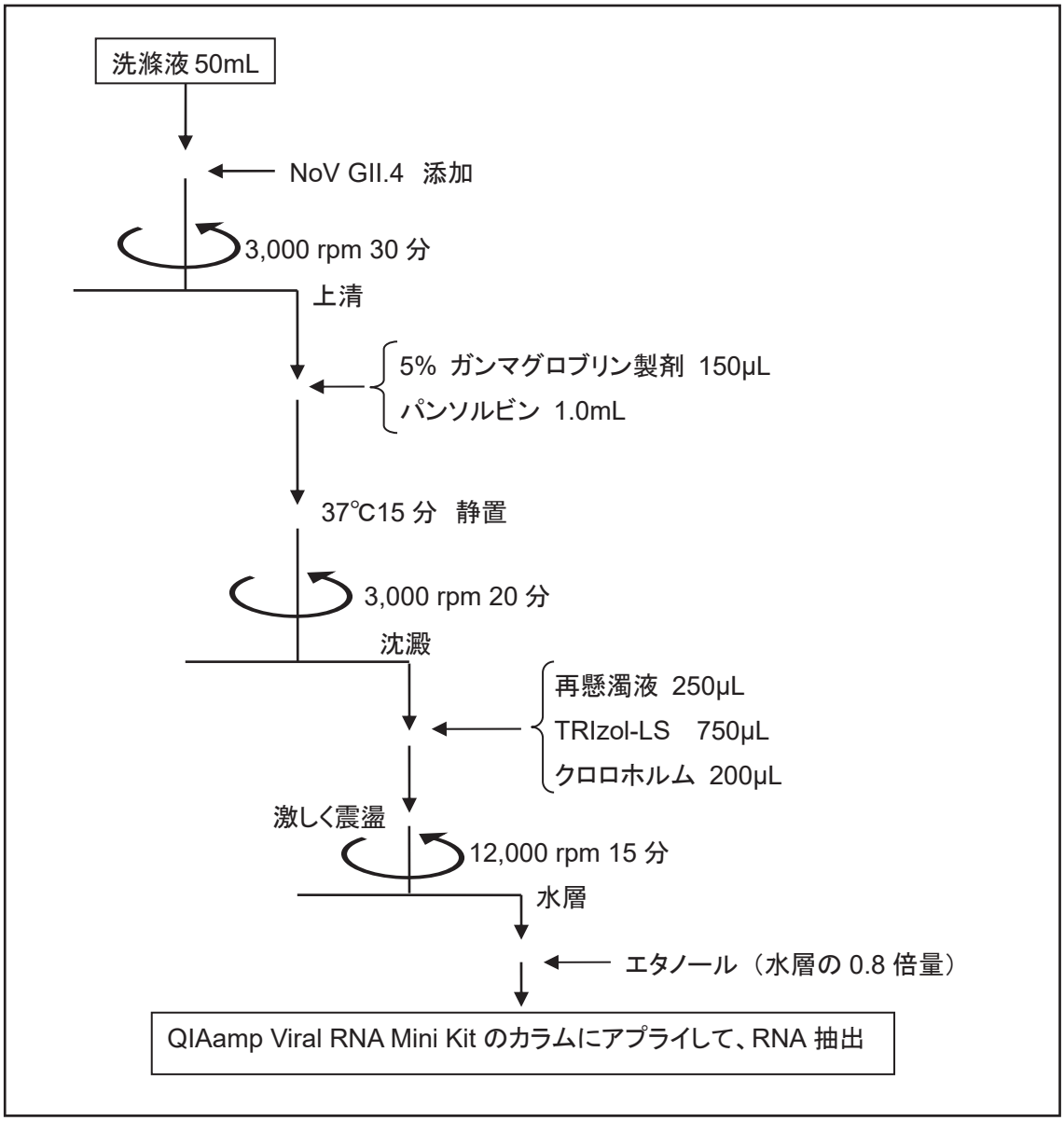
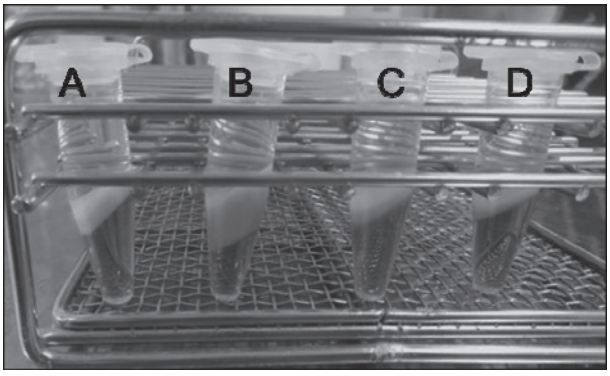
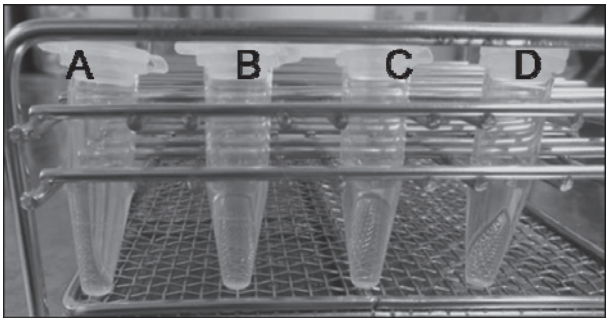


図 1 パンソルビン・トラップ法の操作手順

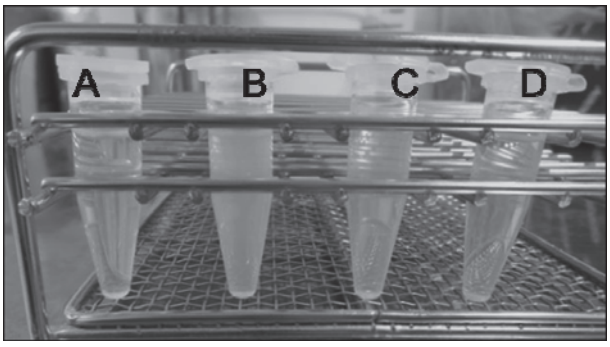
TRIzol-LS /クロロホルム
で抽出し、遠心した状態



水層を分取した状態



0.8 倍量 のエタノールを
添加したところ白濁した
状態（B、C、D）



遠心によって確認された
沈殿物（B、C、D）

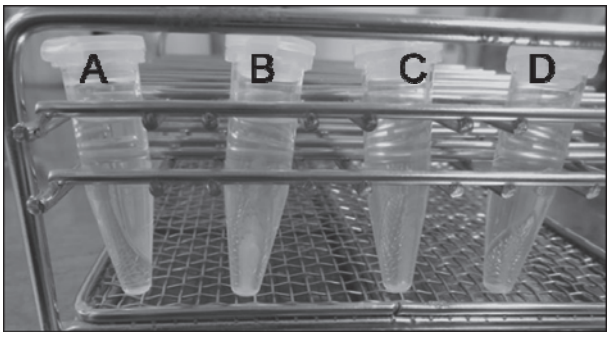


図 2　パンソルビンのロット差の比較

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

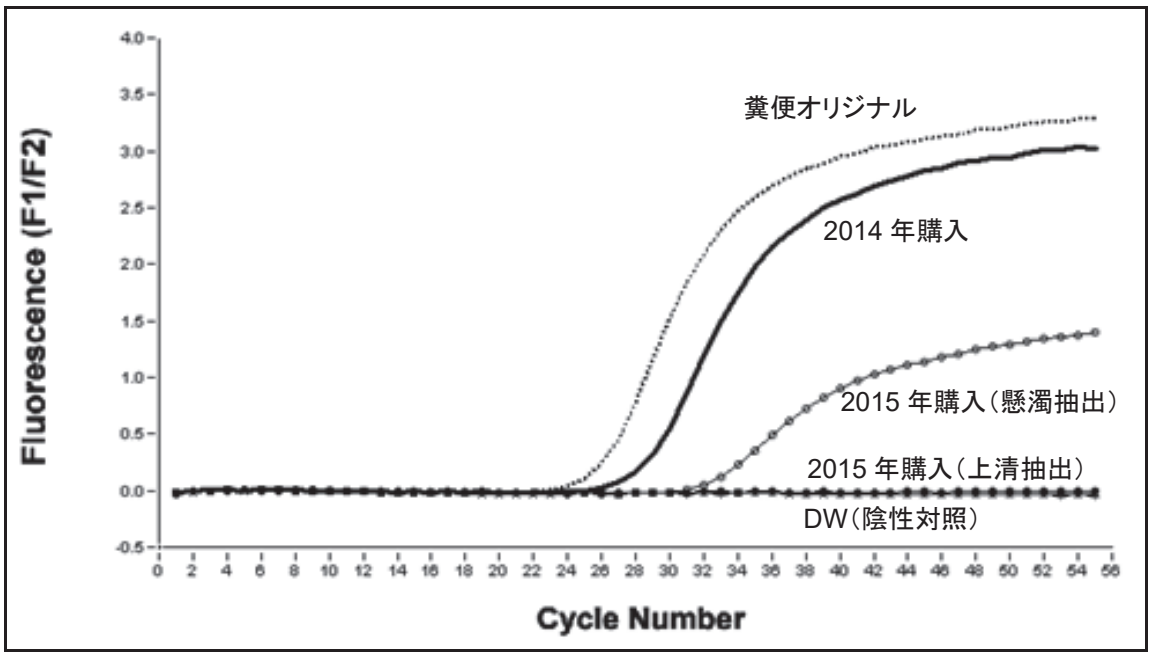


図 3　白濁による回収率の低下（増幅曲線）

10. 1 容量の 70%エタノール（通常 600 µl）を添加し、ピペットによる吸排出を繰り返して完全に混和する。遠心操作は行なわない。すぐにステップ 11 に進む。

注：ホモジナイゼーションと遠心操作中のロスにより、ライセートは 600 µl よりも少ないことがあります。

エタノールの添加後、沈殿物が観察されることがあります。沈殿物を激しく振盪させて完全に再懸濁し、すぐにステップ 11 に進みます。

図 4　抽出キットの添付説明書

	to be loaded onto a polyacrylamide gel, th sample buffer, boiled for 10 min, centrifug supernatant onto the gel. If a high backgro clear lysates, prebind the antibody to PAN (e.g. RIPA). This protocol is meant to serv specific applications.
Activity	Binding capacity: ≥2 mg/ml
Preservative	0.1% sodium azide
Storage	+2°C to +8°C

図 5　パンソルビンの出荷基準

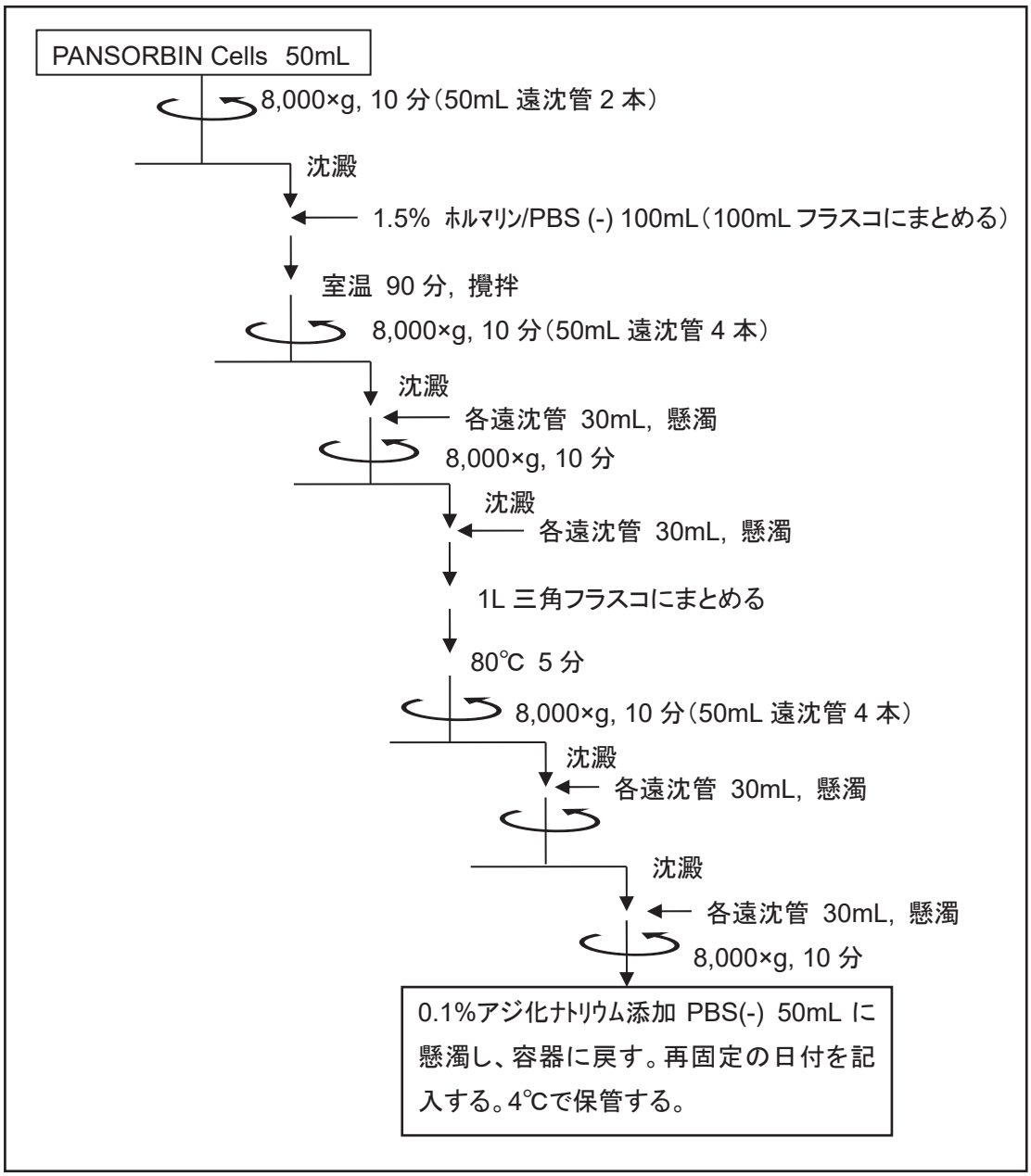
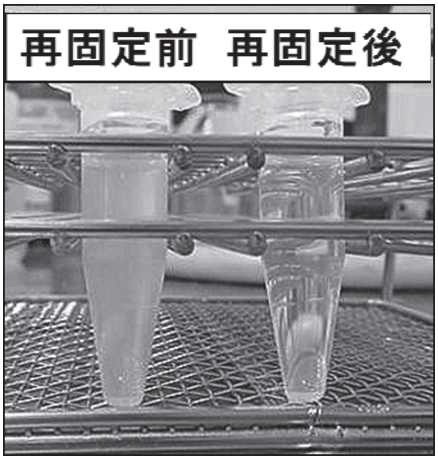


図 6　パンソルビン再固定の手順

TRIzol-LS /クロロホルム
で抽出し、遠心した状態

0.8 倍量 のエタノールを
添加した状態



遠心によって沈殿物を確認

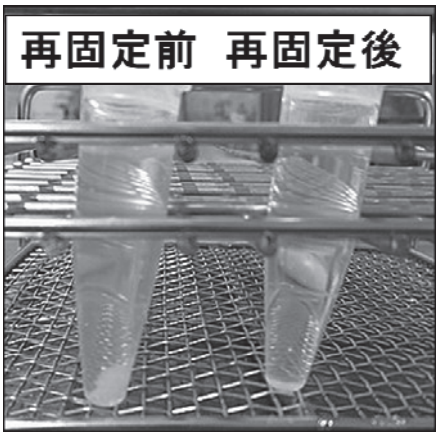


図 7　パンソルビン再固定の効果（抽出操作時の観察）

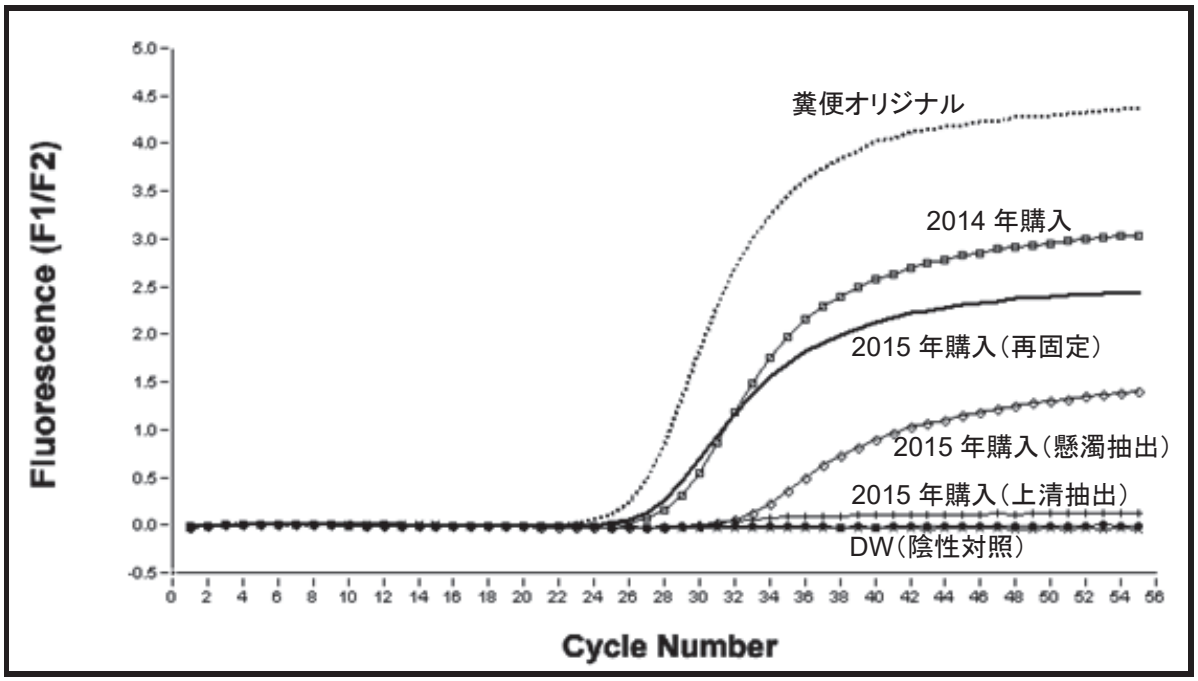


図 8　パンソルビン再固定の効果（増幅曲線）

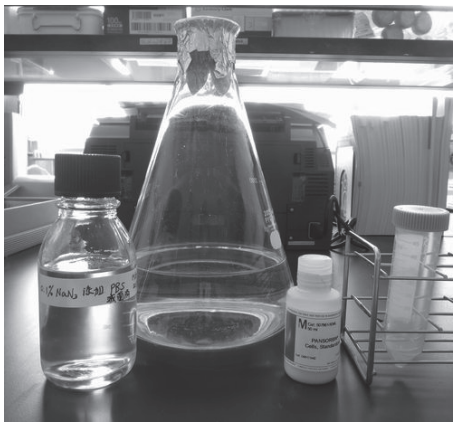
表 1 パンソルビン再固定の効果（回収率の比較）

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

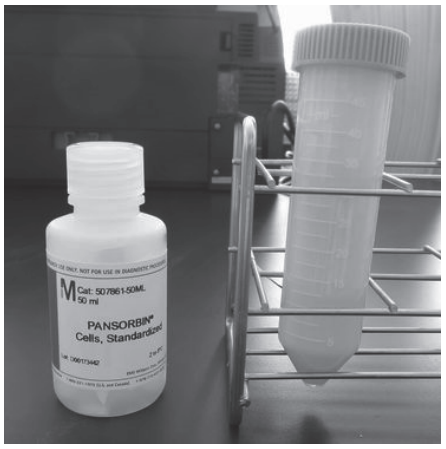
投入量：　1.45×10^5 copies /50mL

【パンソルビン再固定法マニュアル】

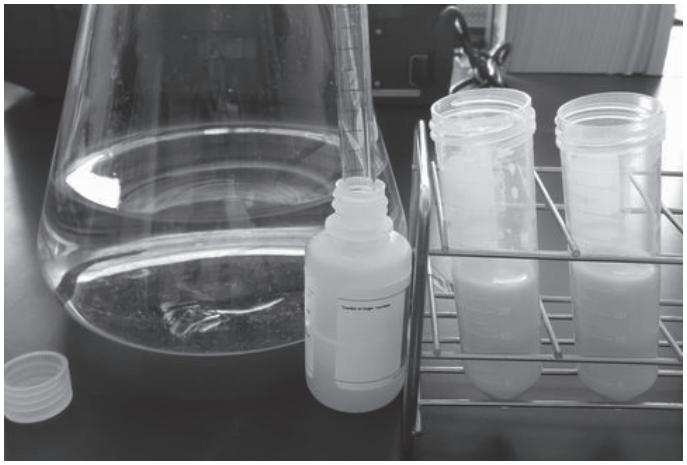
１．購入した PANSORBIN® Cells、PBS(-)、0.1%アジ化ナトリウム、50mL 遠沈管を準備する。



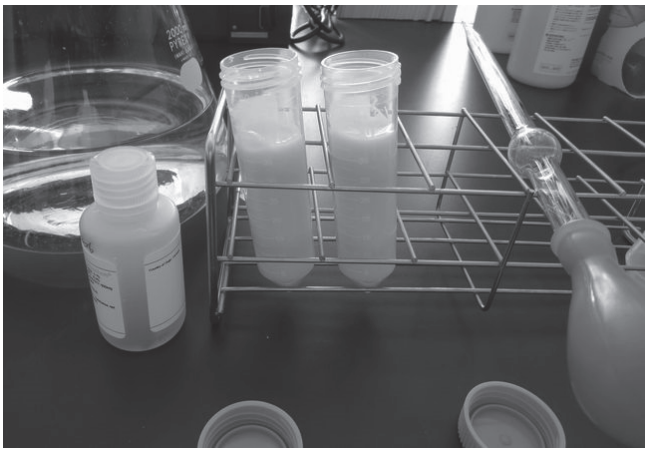
２．PANSORBIN® Cells 全量を 50mL 遠沈管に移し、チューブの目盛で量を確認して記録しておく（重要)。新規開封の場合は 50mL だが、一部使用後に再固定を行う場合は、その量を記録する。



３．遠沈管をもう 1 本用意して、半分に分ける。PANSORBIN® Cells の容器は捨てないで保管する。

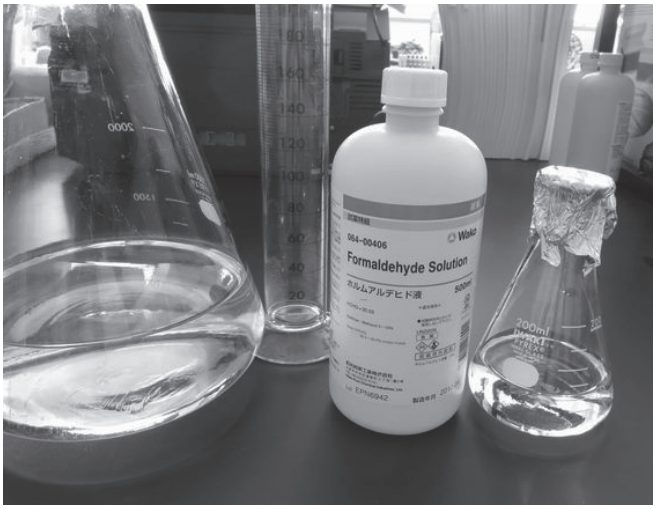


４．PBS(-)を各遠沈管の目盛で 40mL くらいまで追加混合する。遠心機を使う前にバランスを調整する。遠心ローターによっては専用チューブを用いてもよい。駒込ピペットはステップ１５までは、同じものを使い続けて差支えない。

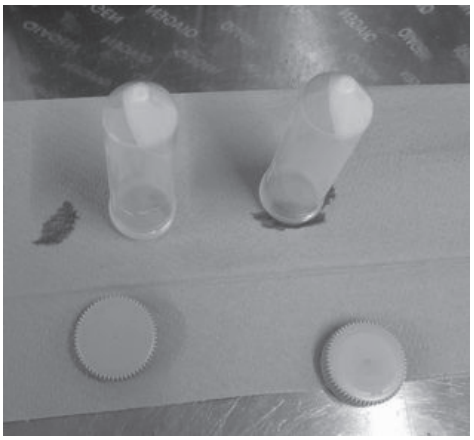


５．8,000×g で 10 分遠心する（4℃）。

６．遠心の待ち時間に固定液を調製する。100mL 三角フラスコに PBS(-)を 96mL 取り、ホルマリン原液 4mL を加えて混合する。

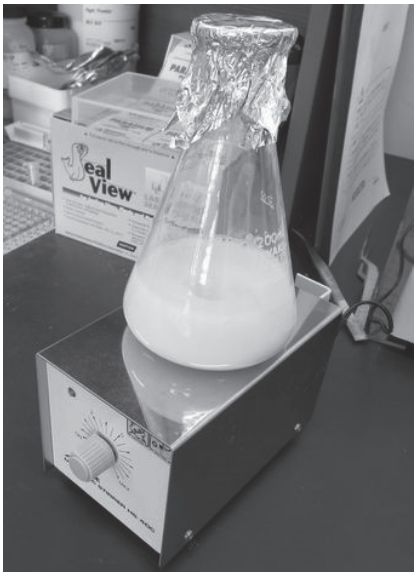


７．遠心が終わったら、上清をデカントして捨て、吸い取り紙の上に遠沈管を逆さに立てる。上清の残りを完全に吸い取らせる。



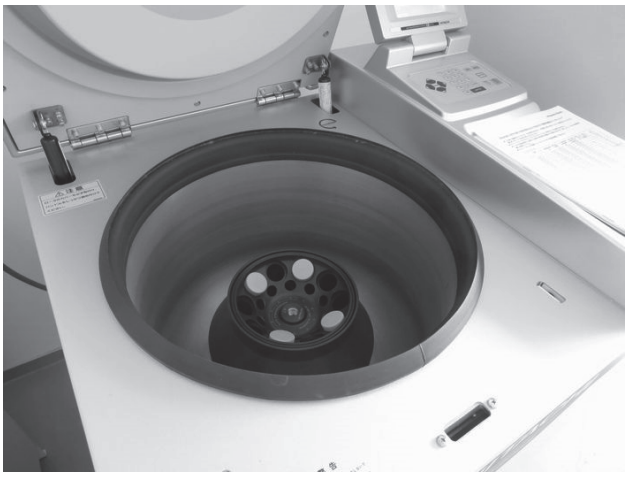
８．PANSORBIN® Cells のペレットに、６で調製した固定液を加えて、駒込ピペットでよく懸濁しながら全量を 100mL 三角フラスコに戻す。

９．回転子を入れて、マグネチックスターラーで撹拌しながら、室温で 90 分処理する（再固定）。



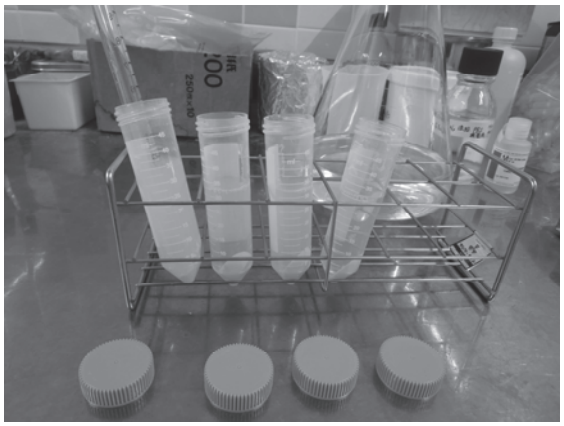
１０．50mL 遠沈管を 4 本用意し、駒込ピペットで、固定後の PANSORBIN® Cells を 4 等分する。専用の遠心チューブを用いても差し支えないが、遠心機にセットしやすいように適宜等分する。

１１．8,000×g で 10 分遠心する（4℃）



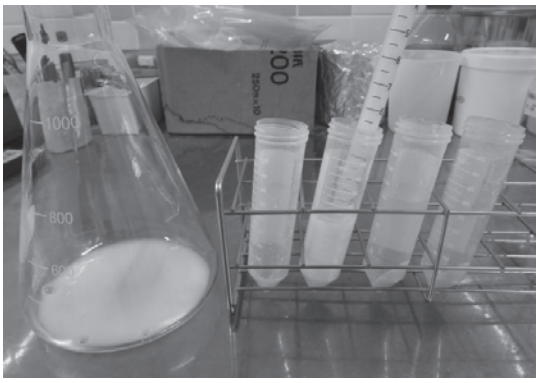
１２．遠心が終わったら、上清をデカントして捨て、吸い取り紙の上に遠沈管を逆さに立てる。上清の残りを完全に吸い取らせる。

１３．遠沈管１本につき PBS(-)を 30mL 加え、ペレットを駒込ピペットでよく懸濁する。固定直後のペレットは均一になりにくいが、多少の凝集塊があっても問題はない。



１４．１１～１２と同様に遠心とデカントを行う。

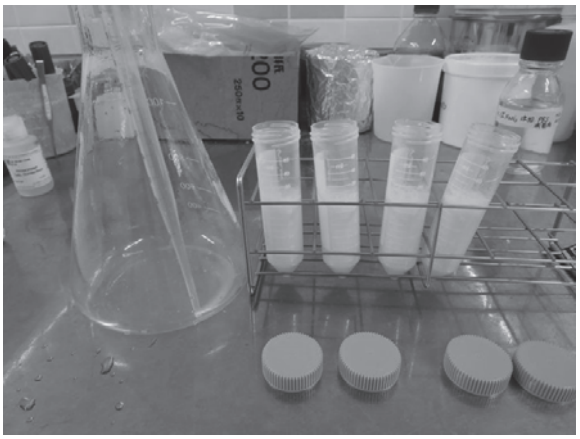
１５．遠沈管１本につき PBS(-)を 30mL 加え、ペレットを駒込ピペットでよく懸濁し、1L 三角フラスコにまとめて入れる。この段階でペレットは均一に懸濁できる。



１６．80℃に設定したホットプレートか、およそ 80℃に保たれた湯煎で三角フラスコを 5 分間加熱する。残っている微量のホルマリンを蒸散させるため、液面の面積を大きくすること（小さなフラスコではうまく蒸散しない)。

１７．氷冷する。

１８．新しい駒込ピペットを用いて、加熱後の PANSORBIN® Cells を 4 等分する。専用の遠心チューブを用いる場合は、遠心機にセットしやすいように適宜等分する。駒込ピペットは、以降のステップで同じものを使い続けて差支えない。



１９．１１～１２と同様に遠心とデカントを行う。

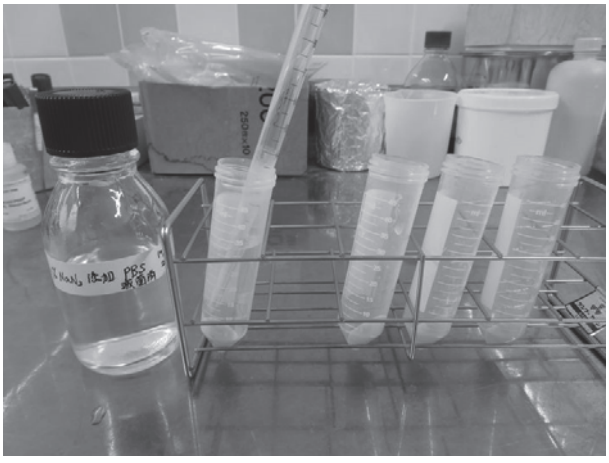
２０．１３と同様に遠沈管 1 本につき PBS(-)を 30mL 加え、ペレットを駒込ピペットでよく懸濁する。ペレットは均一に懸濁できる。

２１．１１～１２と同様に遠心とデカントを行う。

２２．１３と同様に遠沈管 1 本につき PBS(-)を 30mL 加え、ペレットを駒込ピペットでよく懸濁する。

２３．１１～１２と同様に遠心とデカントを行う。

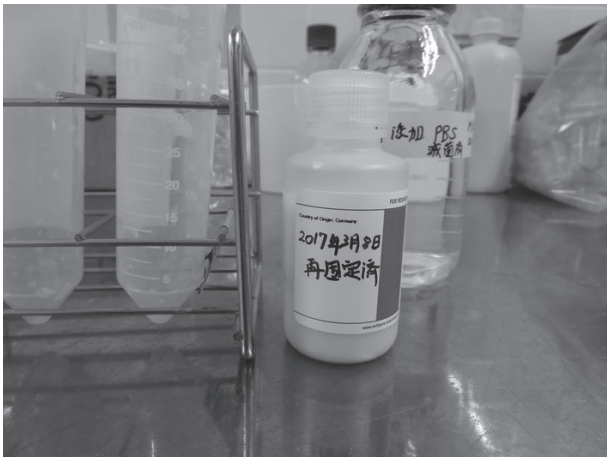
２４．　4 本の遠沈管の内 1 本に、0.1%アジ化ナトリウムを含む PBS(-)を 50mL 加える。２で記録した PANSORBIN® Cells の量が 50mL に満たないときは、記録した量を加える。



２５．駒込ピペットで懸濁しながら、４本の遠沈管のペレットを１本にまとめる。

２６．３で保管しておいた容器に再固定した PANSORBIN® Cells を戻す。

２７．容器に再固定を行った年月日を記入する。以降は、4℃に保管しておき、パンソルビン・トラップ法に用いることができる。



平成 29 年度厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)
「ウイルスを原因とする食品媒介性疾患の制御に関する研究」
研究分担報告

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
	坂　恭平	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
	小泉　光	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
	田村　務	新潟県保健環境科学研究所
	入谷　展弘	大阪健康安全基盤研究所
	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 9 機関を対象として、共通試料を配布することにより外部精度管理調査を行った。検体 7 種〔食品検体：4 種（陰性試料 1 本を含む)、ウイルス懸濁液：3 種（3 種はいずれも同一濃度)、および標準 DNA 溶液を調査検体として配布し、定量検査を各検査機関にて実施した後、回収した結果の解析を行った。なお、繰り返し測定回数は 2 回とした。また、検査方法はあらかじめ指定した共通の方法とし、検量線作成用陽性コントロール溶液も共通とした。その結果、検量線作成では 1 機関において 2 回の測定でばらつきが認められたが、測定傾向は同じであった。一方、標準 DNA 溶液では実測値における変動係数が 0.009 と非常に小さいものであり、精度良く PCR 操作が実施されているものと考えられた。これに対して、ウイルス懸濁液では変動係数が約 0.1 であった。さらに今回初めてきな粉を基材とした食品検体を採用し、濃縮工程を含めた外部精度管理調査を行ったところ、変動係数は従来方式において 0.3～0.4 を示した。また、国際的に推奨されているロバスト統計量を算出したところ、変動係数はウイルス懸濁液では約 0.12、模擬食品検体では 0.2～0.3 となった。

以上のことから、ロバスト方式による解析によってもこれまでの算術的に求めた統計量と同等の統計量が得られることがわかった。また、食品検体を採用することにより、検査工程の増加に伴いウイルス懸濁液と比較すると変動係数は大きくなるものの、結果の評価に耐え得るばらつきであると考えられた。

A. 研究目的

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

B. 研究方法

1. 調査試料

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

2. 外部精度管理調査の実施

協力機関である 9 機関を対象として、2017 年 6 月 12 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)。同様に食品検体の濃縮法についても指定した。また、検量線作成用陽性コントロール DNA 溶液は共通のものを使用し、調査試料と同時に配布した。各検査機関における繰り返し測定回数はそれぞれ 2 回とした。各検査機関より各調査検体の Ct 値、実測値および換算値を回収し、得られた結果について統

計解析を行った。基本統計量の算出は、従来より実施している積率の統計量（従来方式）と国際的に推奨されているロバスト統計量（ロバスト方式）の 2 種とした。なお、ロバスト方式による解析では Huber の H15/proposal 2 を採用した。あわせて、採用した検査方法についても回収した（表 2)。なお、統計解析、Xbar-R 管理図を参考とした管理図および z－スコア管理図の作成には JMP ver.11 を使用した。

(倫理面への配慮)

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

C. 研究結果

1. 検量線の解析

各検査機関において作成された検量線について解析を行った。その結果、全ての検査機関で同等の検量線を作成していたが（図 1)、2 回の繰り返し測定において作成された検量線は 3 種のパターンに分類された。すなわち、2 回の繰り返し測定においてほぼ同等の Ct 値が得られる（A)、低濃度域ではほぼ同等の Ct 値が得られているが、高濃度域においてわずかにばらつきが生じる（B)、および全濃度範囲において同様の傾向が得られているがわずかにずれが生じている（C）である（図 2)。このうち、C のパターンは 1 機関のみであったが、検量線の傾向は同様であった。

2. 調査試料における Ct 値の解析

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

3. 調査試料における実測値の解析

実測値について観察したところ、標準 DNA 溶液および検査試料の対数解析での基本統計量は表 3 のとおりであった。また、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。食品検体において 1 機関で他の検査機関と比較して非常に高い回収率を示したが、原因は不明であった。なお、検体-3 については全ての検査機関で陰性と報告した。検査試料はいずれも 3 本で同一濃度であったが、検査試料間の平均値の比較を行ったところ、ウイルス懸濁液および食品検体のいずれにおいても有意差は認められなかった。従来方式と国際的な推奨方法であるロバスト方式で平均値を比較するとよく一致していた。これに対して標準偏差では標準 DNA 溶液とウイルス懸濁液といった従来から使用している検体では比較的近い数値が得られたが、食品検体では従来方式のほうが明らかに大きかった。

4. 調査試料における換算値の解析

検査試料の 1 mL あたりの換算値の対数解析での基本統計量は表 5 のとおりであった。実測値の場合と同様、報告値の平均値において検査試料間で有意差は認められなかった（データには示していない)。また、換算値は実測値から係数を掛けることによって算出されることから、報告値の分布が実測値と大きく変わらないため、変動係数は実測値と比較すると小さくなった。

5. 外部精度管理調査の評価方法の検討

外部精度管理調査における最終的な目的は参加機関から提出された結果の評価を行うことである。そこで、上記の解析により得られた統計量を用いた評価を行った。すなわち、今回の外部精度管理調査では 2 回の繰り返し測定を行ったことから、2 回の測定の差、すなわち R を評価対象として加え、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－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、標準 DNA 溶液において 1 機関で z－スコアが 3 以上、食品検体では 1 または 2 機関で z －スコアが 2 以上となったが、ウイルス懸濁液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 管理図では検体-5 で管理限界線を超える機関が 1 機関認められた。

D. 考察

各検査機関より回収した検量線の相関係数はいずれも 0.99 以上であり、問題ないと考えられた。また、一部の機関において高濃度域でばらつきが認められたが、この原因は不明であった。なお、今回の検量線は 10^1 コピーを最小濃度としているが、この濃度以上の範囲においては直線的に定量可能であることが明らかとなった。一方、標準 DNA 溶液では実測値の範囲が 0.2 と非常に小さく、精度良く PCR 操作が実施されているものと考えられた。また、ウイルス懸濁液についてはこれまでも継続的に実施していることもあり、範囲も 1 以内であった。これまで参加機関の評価を行うために結果のばらつきを小さくするためのスキームを計画してきたが、そのひとつの要因として検量線作成用陽性コントロール DNA 溶液共通配布が挙げられる。しかし、実際の検査業務ではそれぞれの検査機関で陽性コントロール DNA 溶液を用意することから、今後はより実際の検査体制を踏まえたうえでの外部精度管理調査を実施してもよいのかもしれない。なお、ウイルス懸濁液については同一濃度の 3 本の平均値を比較してもほぼ同等の値となっていることからも、各検査機関が安定して検査を行っていることの証明にもなるものであると考えられる。これに対して、今回初めてきな粉を用いた食品検体を採用し、濃縮工程を含んだ外部精度管理調査を実施した。当初の予測では各検査機関で濃縮工程に伴うばらつきが非常に大きくなると考えていたが、実際のロバスト方式における変動係数は 0.2 から 0.3 であり、ウイルス懸濁液の約 2 倍の値であったことから、参加機関の評価に十分耐えうるばらつきであるものと考えられた。なお今回、積率の統計量である従来方式と国際的な推奨方法であるロバスト方式の両者を用いた解析を行ったが、結果のばらつきの小さい標準 DNA 溶液やウイルス懸濁液では同等の変動係数を示したが、これらと比較するとばらつきの大きい食品検体ではロバスト方式のほうが明らかに変動係数は小さくなった。これはロバスト

方式が異常値の影響を受けない方式であり、強制的に作った正規分布の中で統計量を算出するためである。しかし、一般的に正しいｚースコアを算出するためには正規分布に近似させる必要があり、そのためには棄却検定等の操作を行うこととなることから、結果的にはロバスト統計量に近似した値になることが予想される。以上のことから、今後のノロウイルス検査の外部精度管理調査における基本的な統計解析方法はロバスト統計量を用いることが望ましいものと考えられた。さらにこのロバスト統計量を用いた各参加機関の評価を Xbar-R 管理図で行った。その結果、標準 DNA 溶液と検体-2 においてｚースコアの絶対値が 3 以上となる検査機関が検出された。しかし、ｚースコアの絶対値が 3 以上となった標準 DNA 溶液における検査機関の実測値は平均値と比較して 0.1 高いのみであり、明らかな異常値であると判断することはできないと考えられる。すなわち、ｚースコアを用いた評価を行うにあたり、報告値から算出された標準偏差を用いた場合に、ばらつきが明らかに小さいときには標準偏差が小さくなり、結果として異常値として検出される検査機関が発生する可能性がある。そのため、実測値との併行評価や経験則に基づいた標準偏差を設定することが、より正しい参加機関の評価を行うために求められると思われる。

E. 結論

ノロウイルス GII 陽性または陰性の検査試料、合計 7 種（食品検体とウイルス懸濁液）と標準 DNA 溶液を調査試料として採用した外部精度管理調査を 9 機関を対象に実施した。その結果、標準 DNA 溶液では実測値において 0.005 という非常に小さな変動係数が得られた。一方、ウイルス懸濁液では 0.13 であった。これらのことから参加した検査機関が非常に精度良く検査を遂行しているものと考えられた。また、今回きな粉を基材とした食品検体についても実施したが、濃縮工程を含むにも関わらず変動係数は 0.2 から 0.3 であり、ウイルス懸濁液と比較しても約 2 倍であった。これらの統計量をもとに参加機関の評価を Xbar-R 管理図を用いて行ったところ、標準 DNA 溶液と検体-2 においてｚースコアの絶対値が 3 以上の検査機関が検出された。しかし、標準 DNA 溶液における限界外機関の実測値は平均値と比較して 0.1 高いのみであることから、明らかな異常値とは判断することができないと考えられる。このことは結果報告値をもとに算出した標準偏差を用いることの問題点としても考えられることから、ノロウイルス検査における適正な標準偏差を経験則をもとに求めることも必要であると考えられた。また、食品検体を用いた際にも参加機関の評価を実施するに耐えうる統計量が得られたことから、カキのような実際の検査事例として多いものを検体として採用することも検討する必要があると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

3. その他：なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし

表1　指定した検査方法の詳細

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

表2　各検査機関における採用手法(1/2)

検査方法			機関A	機関B	機関C	機関D	機関E
RNA抽出	RNA抽出キット		QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, 52904)	QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, 52904)	Deoxyribonuclease(RT Grade)(ニッポンジーン, No.313-03161)	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)	Deoxyribonuclease(RT Grade)(ニッポンジーン, No.313-03161)	Recombinant DNase I(タカラ, No. 2270A)	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	5×First-Strand Buffer: Super Script Ⅱ RNase H- Reverse Transcriptase(life technologies, 18064-01)に添付	5×First-Strand Buffer: Super Script Ⅱ RNase H- Reverse Transcriptase(life technologies, 18064-01)に添付	5×First-Strand Buffer: Super Script Ⅱ RNase H- Reverse Transcriptase(life technologies, 18064-01)に添付	5×First-Strand Buffer: Super Script Ⅱ Reverse Transcriptase (life technologies, 18064-014)に添付
	装置		ABI 2720 (life technologies)	GeneAmp® PCR System 9700	BT-23 (ヤマト科学株式会社)	Applied Biosystems 2720サーマルサイクラー	Astec PC-805
逆転写反応	逆転写酵素		Super Script Ⅱ RNase H- Reverse Transcriptase (life technologies, 18064-014):	Super Script Ⅱ RNase H- Reverse Transcriptase (life technologies, 18064-014):	Super Script Ⅱ RNase H- Reverse Transcriptase (life technologies, 18064-014):	Super Script Ⅱ RNase H- Reverse Transcriptase (life technologies, 18064-014):	Super Script Ⅱ RNase 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	反応用バッファー(5× SSII Buffer)および100mM DTT	反応用バッファー(5× SSII Buffer)および100mM DTT	反応用バッファー(5× SSII Buffer)および100mM DTT	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)	Recombinant Ribonuclease Inhibitor(タカラ, 2313A)	Recombinant Ribonuclease Inhibitor(タカラ, 2313A)	Recombinant Ribonuclease Inhibitor(タカラ, 2313A)	Rnase インヒビター(ナカライテスク、30260-96)
	cdNTPs mix		Expand High Fidelity PCR System, dNTPack (Roche, 04738276001)に添付	100 mM dNTP Set (life technologies, 10297018)	Deoxynucleotide (dNTP) Solution Mix (New England BioLabs, N0447S)	10mM dNTPs mix(life technologies, 18427-013)	2.5mM dNTP mixture (タカラ、SD0304)
	プライマー		ランダムプライマー(life technologies, 48190-011)	Random Hexamers (life technologies, N8080127)	ランダムプライマー(life technologies, 48190-011)	ランダムプライマー(life technologies, 48190-011)	ランダムプライマー(タカラ、3801)
	装置		ABI 2720 (life technologies)	GeneAmp® PCR System 9700	BT-23 (ヤマト科学株式会社)	Applied Biosystems 2720サーマルサイクラー	Astec PC-805
リアルタイムPCR	マスターミックス		Taq Man Universal Master Mix	Taq Man Universal Master Mix	LightCycler480 Probes Master (Roche Diagnostics)	Taq Man Universal Master Mix	Taq Man Universal Master Mix
	プライマー(合成受託会社)	COG2F	Life Technologies	ファスマック	ファスマック	Applied Biosystems	Fasmac
		ALPF	Life Technologies	ファスマック	日本遺伝子研究所	Applied Biosystems	Fasmac
		COG2R	Life Technologies	ファスマック	ファスマック	Applied Biosystems	Fasmac
	プローブ(合成受託会社)	RING2AL-TP	Life Technologies	life technologies	Thermo Scientific	Applied Biosystems	Applied Biosystems
	リアルタイムPCR装置		7900HT (life technologies)	7500(life technologies)	LightCycler480 (Roche Diagnostics)	7500Fast Real-Time PCR System(Applied Biosystems)	7900 (life technologies)

表3 各検査機関における採用手法(2/2)

検査方法			機関F	機関G	機関H	機関I
RNA抽出	RNA抽出キット		QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, 52904)	QIAamp Viral RNA Mini 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)	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	5×First-Strand Buffer: Super Script Ⅱ RNase H- Reverse Transcriptase(life technologies, 18064-01)に添付	5×First-Strand Buffer: Super Script Ⅱ RNase H- Reverse Transcriptase(life technologies, 18064-01)に添付	5×First-Strand Buffer: Super Script Ⅱ RNase H- Reverse Transcriptase(life technologies, 18064-01)に添付
	装置		Mastercycler gradient (eppendorf)	ABI2720	TaKaRa PCR Thernal Cycler Dice TP600(タカラバイオ)	ASTEC PC350
逆転写反応	逆転写酵素		Super Script Ⅱ RNase H- Reverse Transcriptase (life technologies, 18064-014):	Super Script Ⅱ RNase H- Reverse Transcriptase (life technologies, 18064-014):	Super Script Ⅱ RNase H- Reverse Transcriptase (life technologies, 18064-014):	Super Script Ⅱ RNase H- Reverse Transcriptase (life technologies, 18064-014):
	反応バッファー		反応用バッファー(5× SSII Buffer)および100mM DTT	反応用バッファー(5× SSII Buffer)および100mM DTT	反応用バッファー(5× SSII Buffer)および100mM DTT	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)	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)	dNTPs mix(Roche#11814362001)	10mM dNTPs mix(life technologies, 18427-013)	10mM dNTPs mix(life technologies, 18427-013)
	プライマー		Randam 6mers(タカラ, RR037A)	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(life technologies, 48190-011)
	装置		Mastercycler gradient (eppendorf)	ABI2720	TaKaRa PCR Thernal Cycler Dice TP600(タカラバイオ)	ASTEC PC350
リアルタイムPCR	マスターミックス		Taq Man Universal Master Mix	Taq Man Universal Master Mix	Taq Man Universal Master Mix	Taq Man Universal Master Mix
	プライマー(合成受託会社)	COG2F	life technologies japan	サーモフィッシャーサイティフィック	ファスマック	life technologies
		ALPF	life technologies japan	フナコシ	ファスマック	life technologies
		COG2R	life technologies japan	サーモフィッシャーサイティフィック	ファスマック	life technologies
	プローブ(合成受託会社)	RING2AL-TP	life technologies japan	eurofins	life technologies	life technologies
	リアルタイムPCR装置		7500(life technologies)	7500(life technologies)	7500 Fast(life technologies)	7500(life technologies)

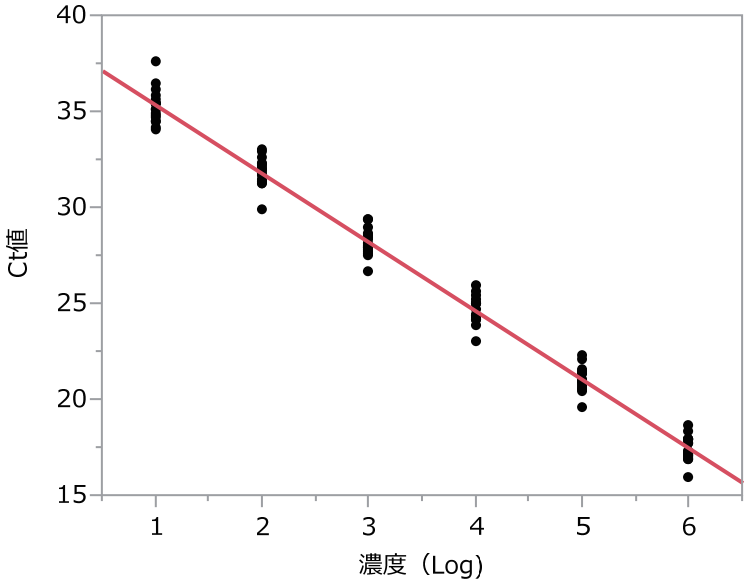


図1　各検査機関の検量線のまとめ

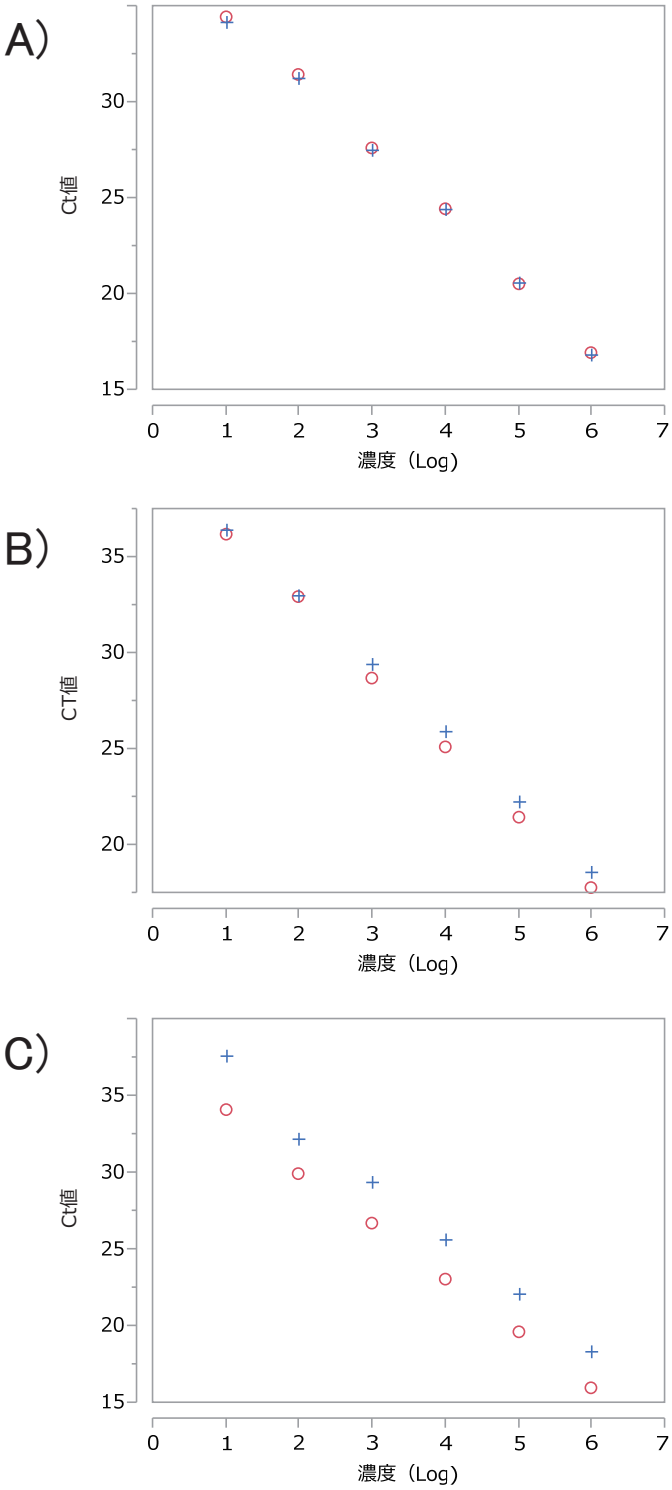


図2　検量線の代表的パターン
○、＋は1回目および2回目の検量線の測定値を示す。

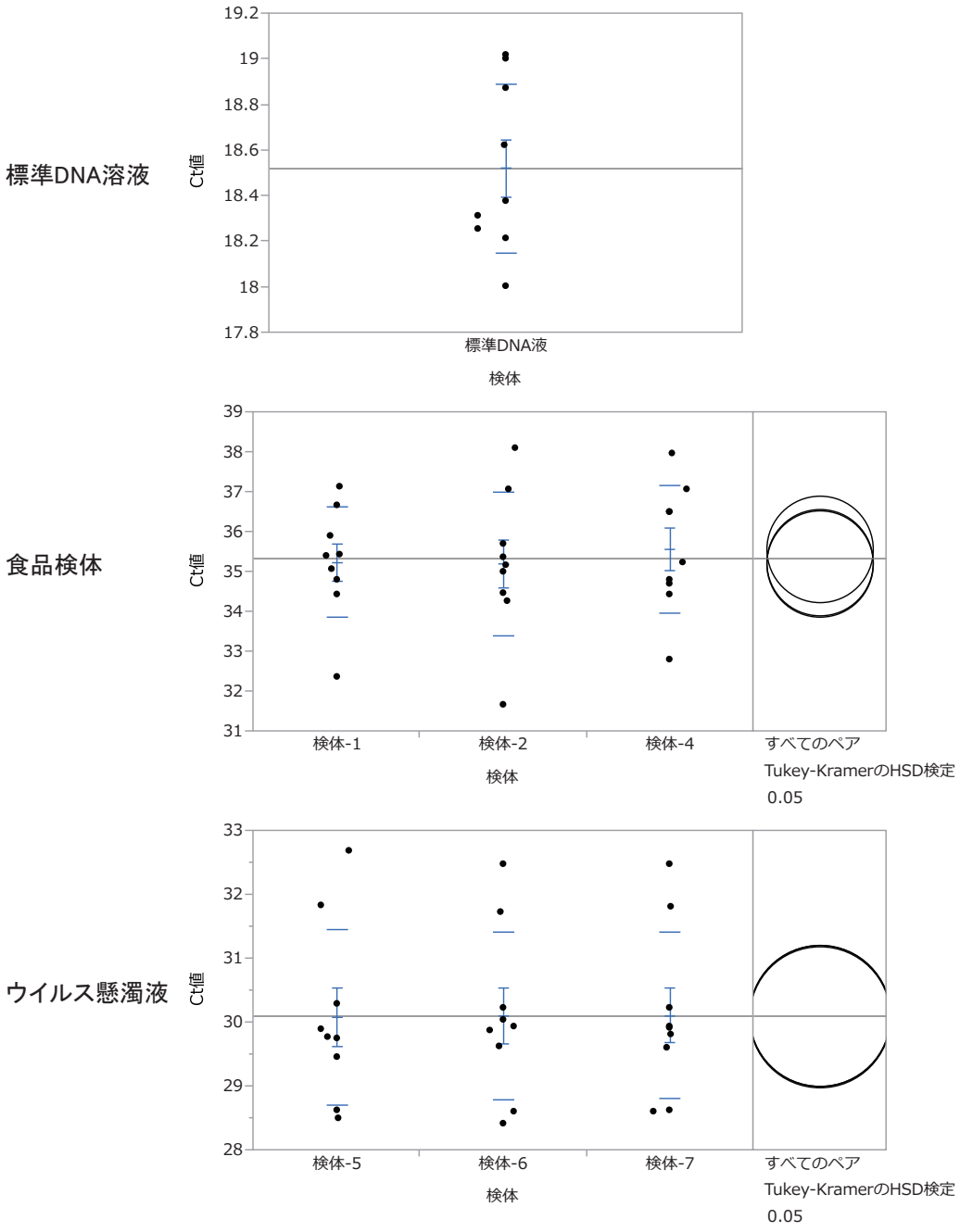


図3　調査試料におけるCt値のデータ分布
ウイルス懸濁液および食品検体における平均値の比較はTukey-KrammerのHSD検定により行った。

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）

検体		従来方式				ロバスト方式			
		平均	±	標準偏差	変動係数	平均	±	標準偏差	変動係数
ウイルス懸濁液	検体−5	2.475482	±	0.313232	0.126534	2.478737	±	0.348253	0.140496
	検体−6	2.471287	±	0.285914	0.115694	2.476259	±	0.313609	0.126646
	検体−7	2.468499	±	0.285194	0.115533	2.478380	±	0.301925	0.121824
食品検体	検体−1	1.039332	±	0.315435	0.303498	0.997391	±	0.253086	0.253748
	検体−2	1.057942	±	0.419815	0.396822	1.042132	±	0.205603	0.197291
	検体−4	0.949282	±	0.371412	0.391255	0.950919	±	0.308734	0.324670
標準DNA液		5.705551	±	0.049595	0.008692	5.700587	±	0.030855	0.005413

単位：log（コピー）

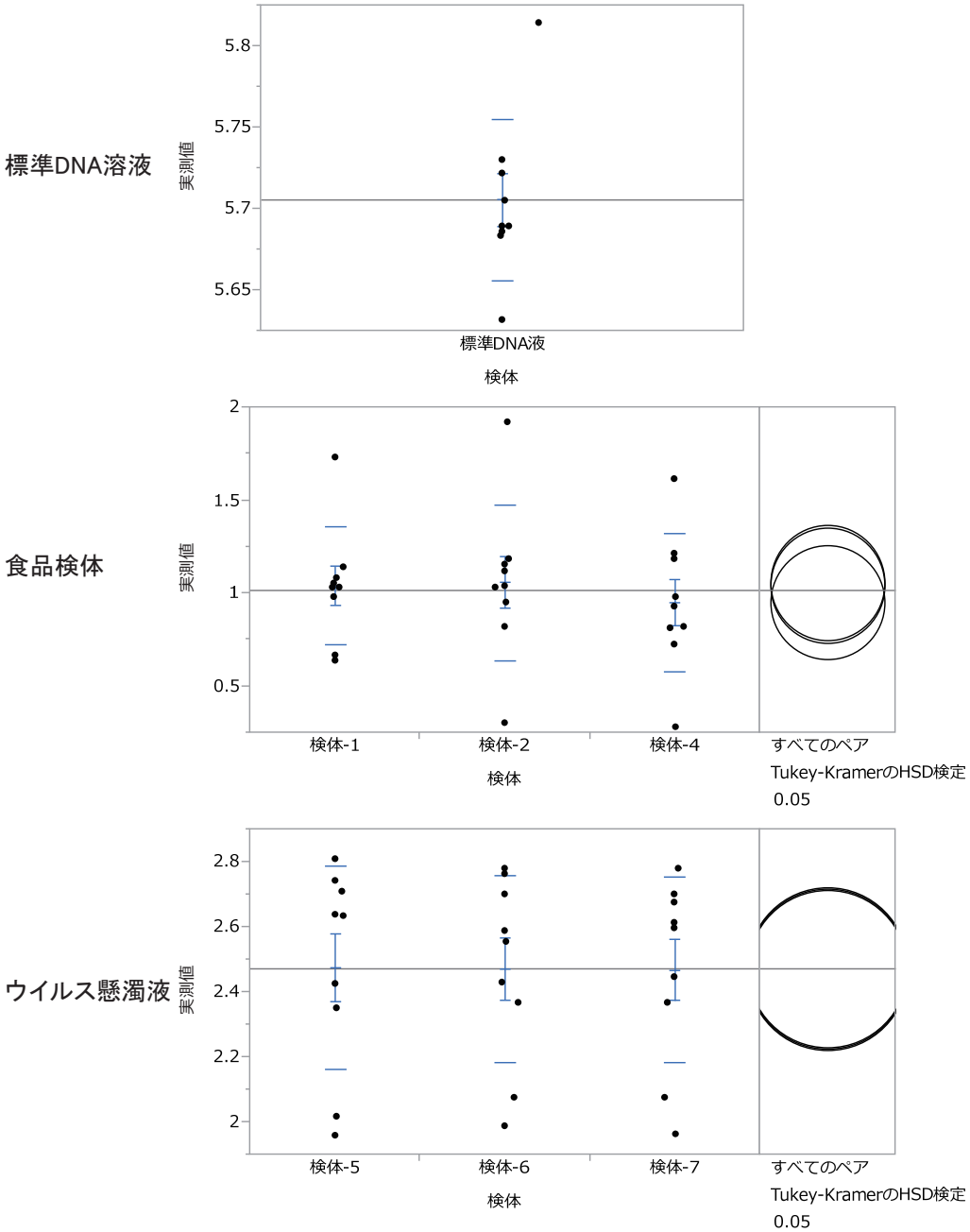


図4　調査試料における実測値のデータ分布
ウイルス懸濁液および食品検体における平均値の比較はTukey-KrammerのHSD検定により行った。

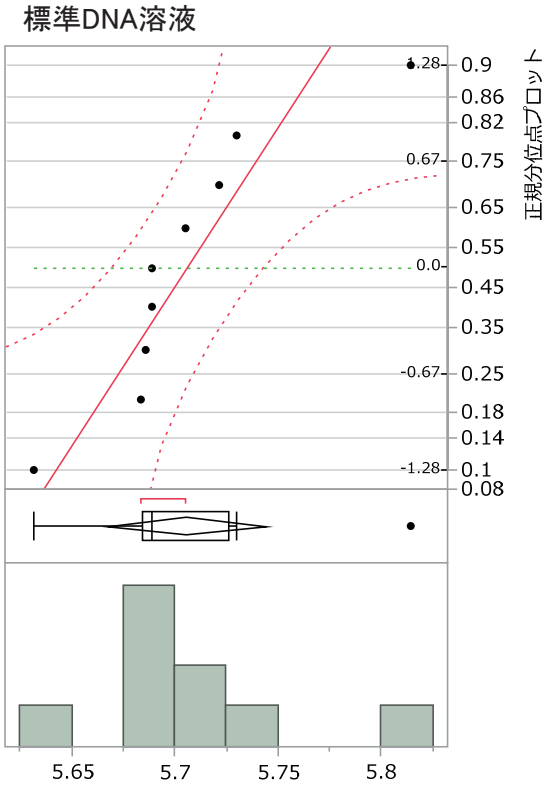


図5　標準DNA溶液におけるヒストグラムと正規確率プロット（実測値）

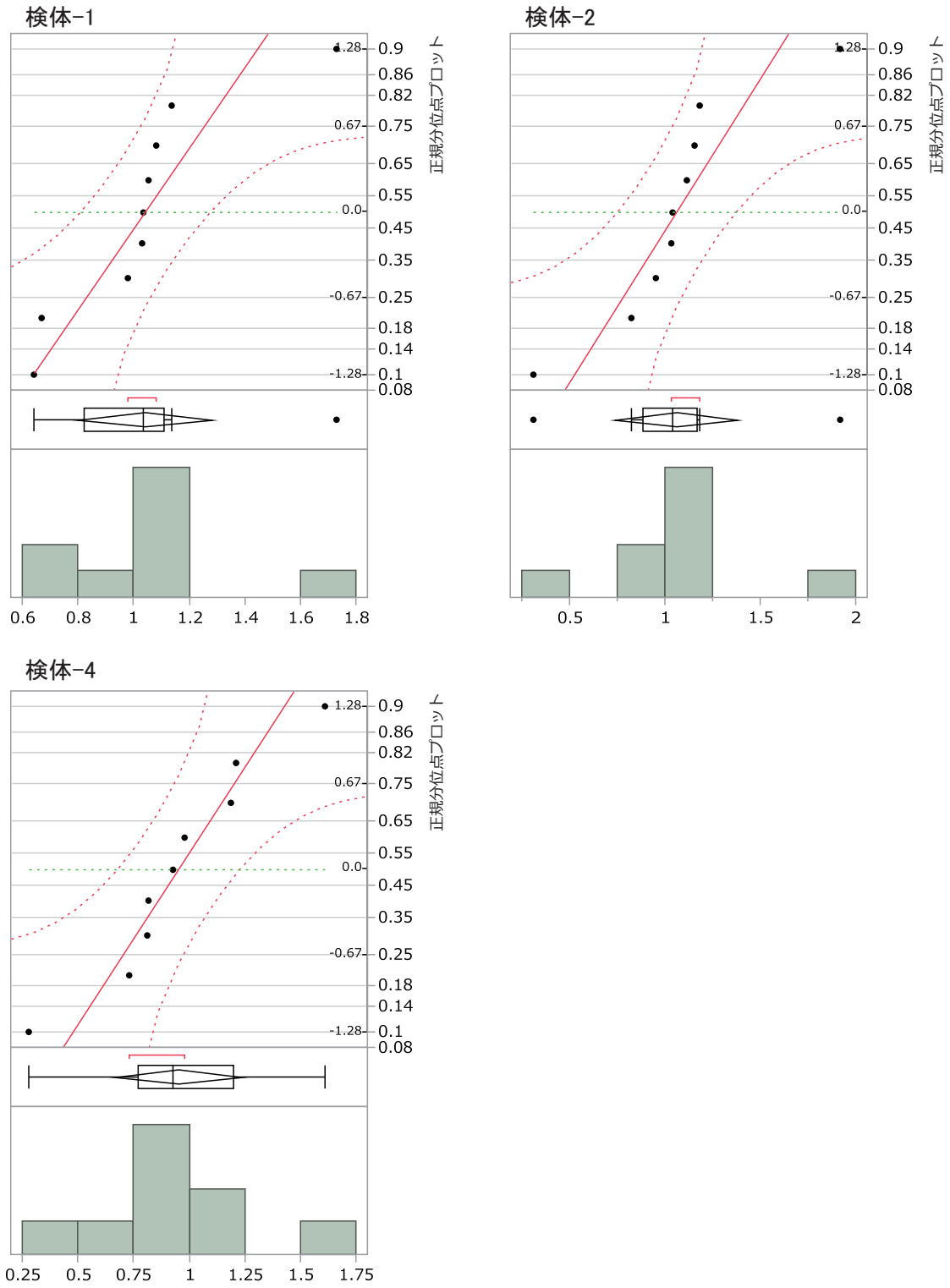
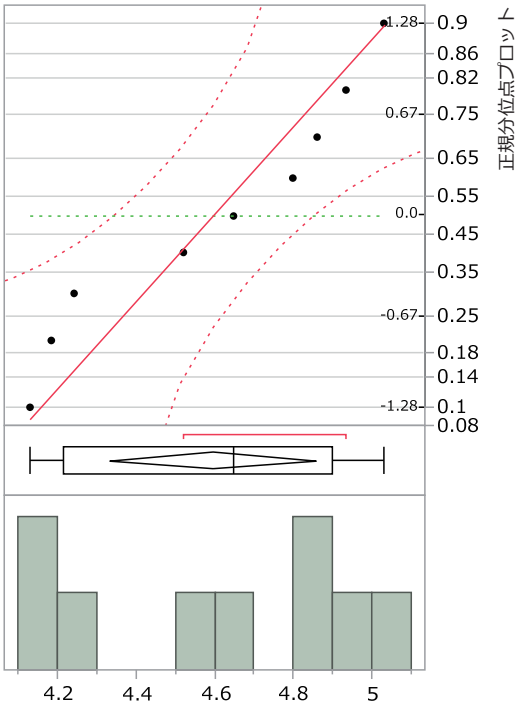
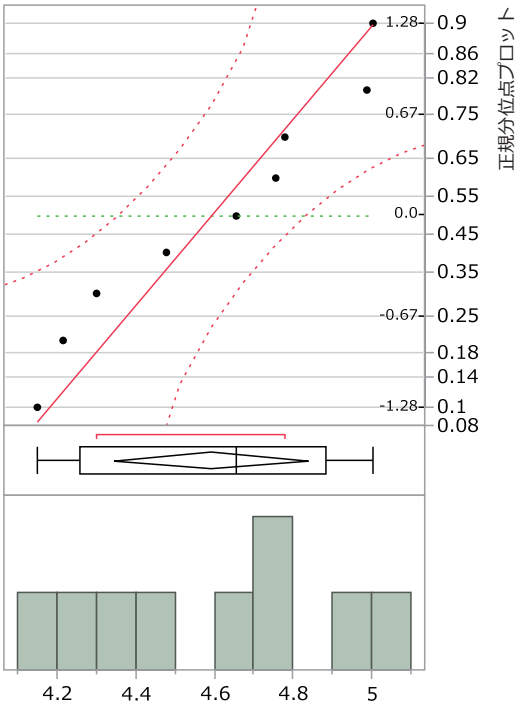


図6　食品検体におけるヒストグラムと正規確率プロット（実測値）

検体-5



検体-6



検体-7

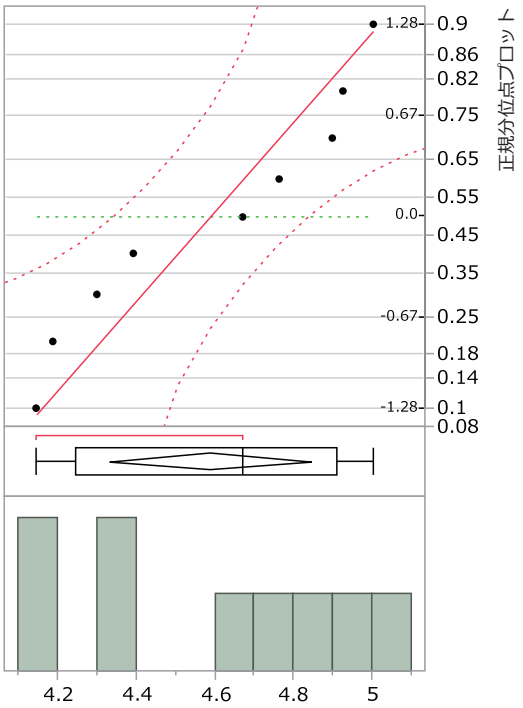


図7　ウイルス懸濁液におけるヒストグラムと正規確率プロット（実測値）

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）

検体		従来方式				ロバスト方式			
		平均	±	標準偏差	変動係数	平均	±	標準偏差	変動係数
ウイルス懸濁液	検体−5	4.595093	±	0.343321	0.074714	4.595093	±	0.389118	0.084681
	検体−6	4.590898	±	0.322484	0.070244	4.590898	±	0.365501	0.079614
	検体−7	4.588110	±	0.335222	0.073063	4.588110	±	0.379938	0.082809
食品検体	検体−1	3.588677	±	0.320741	0.089376	3.541887	±	0.244937	0.069154
	検体−2	3.599361	±	0.421471	0.117096	3.573526	±	0.203406	0.056920
	検体−4	3.490701	±	0.375093	0.107455	3.482312	±	0.322845	0.092710

単位：log（コピー/mL）

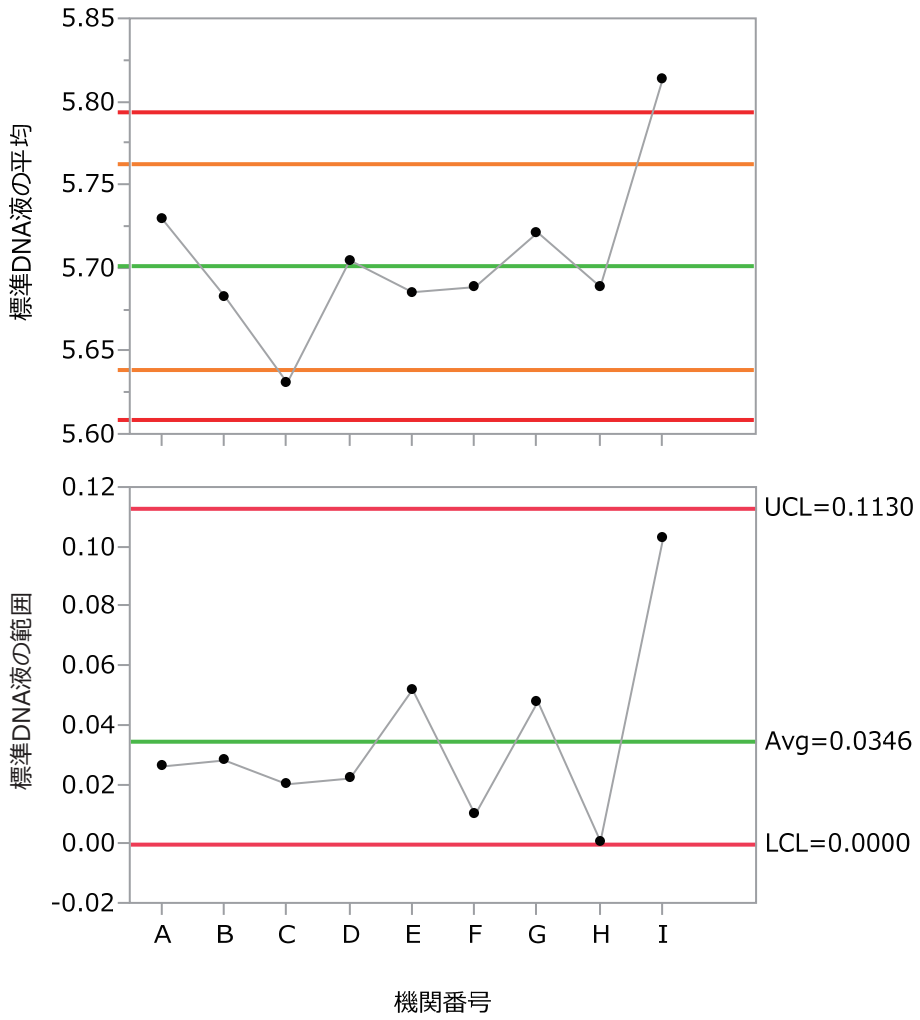


図8　標準DNA溶液におけるXbar−R管理図による評価(実測値)
Xbar管理図における管理限界線は｜ｚースコア｜=2および3とした。

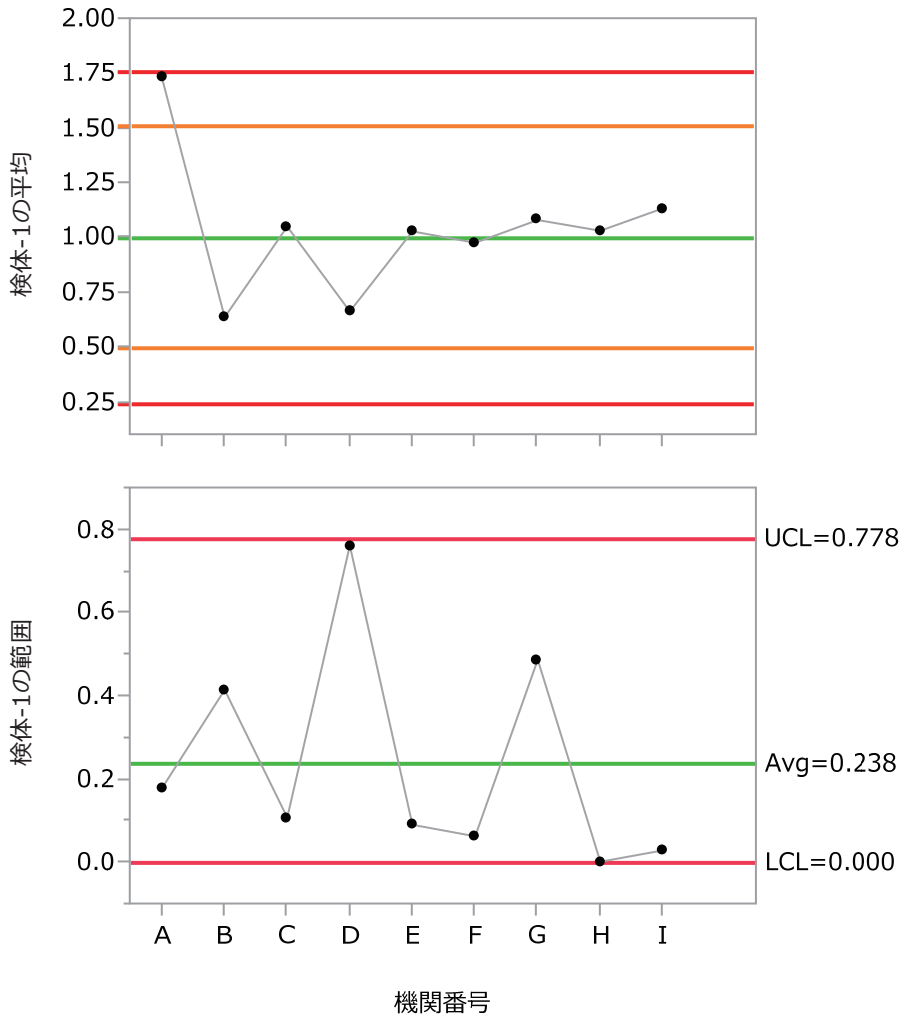


図9　検体−1におけるXbar−R管理図による評価(実測値)
Xbar管理図における管理限界線は｜zースコア｜=2および3とした。

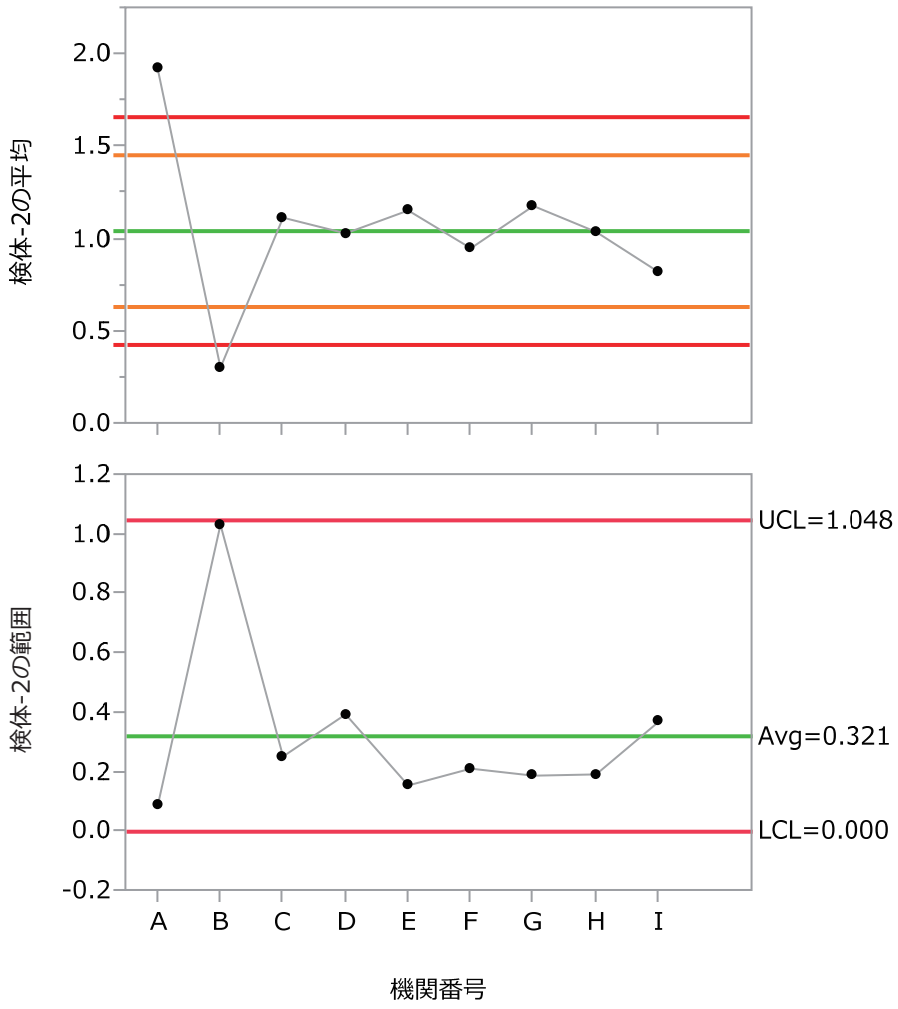


図10　検体-2におけるXbar-R管理図による評価(実測値)
Xbar管理図における管理限界線は｜zースコア｜=2および3とした。

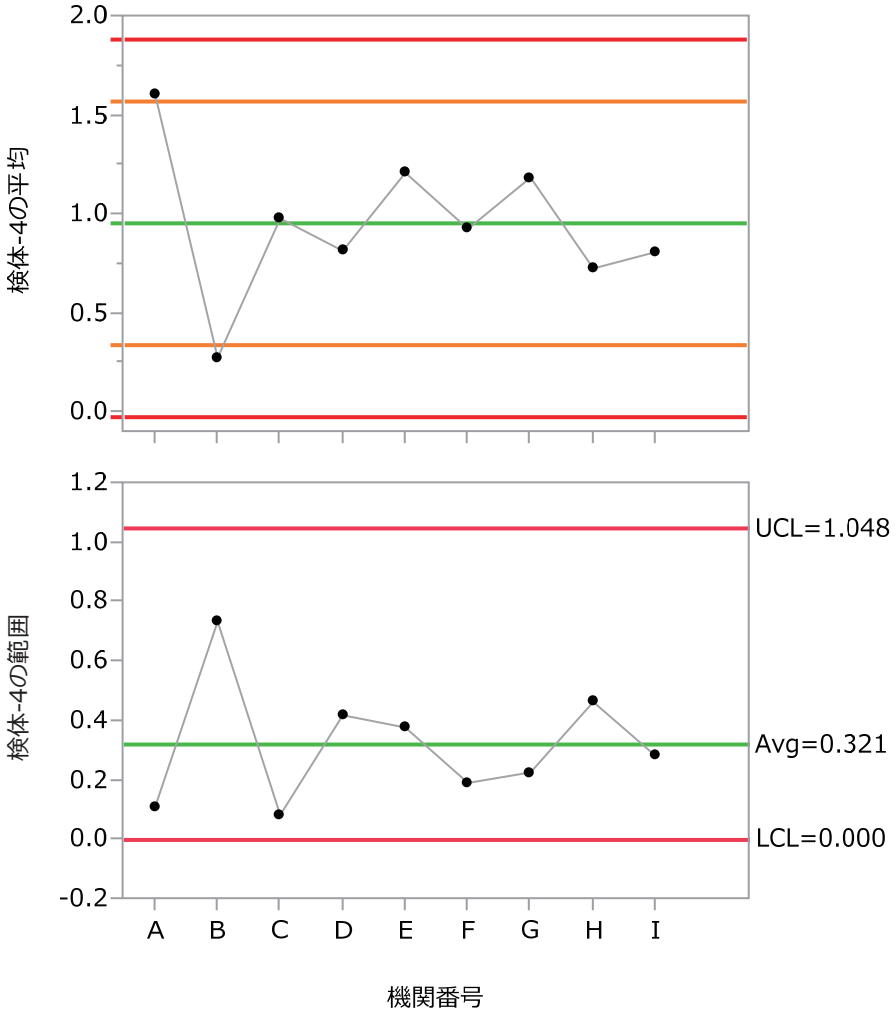


図11　検体−4におけるXbar−R管理図による評価(実測値)
Xbar管理図における管理限界線は｜ｚースコア｜=2および3とした。

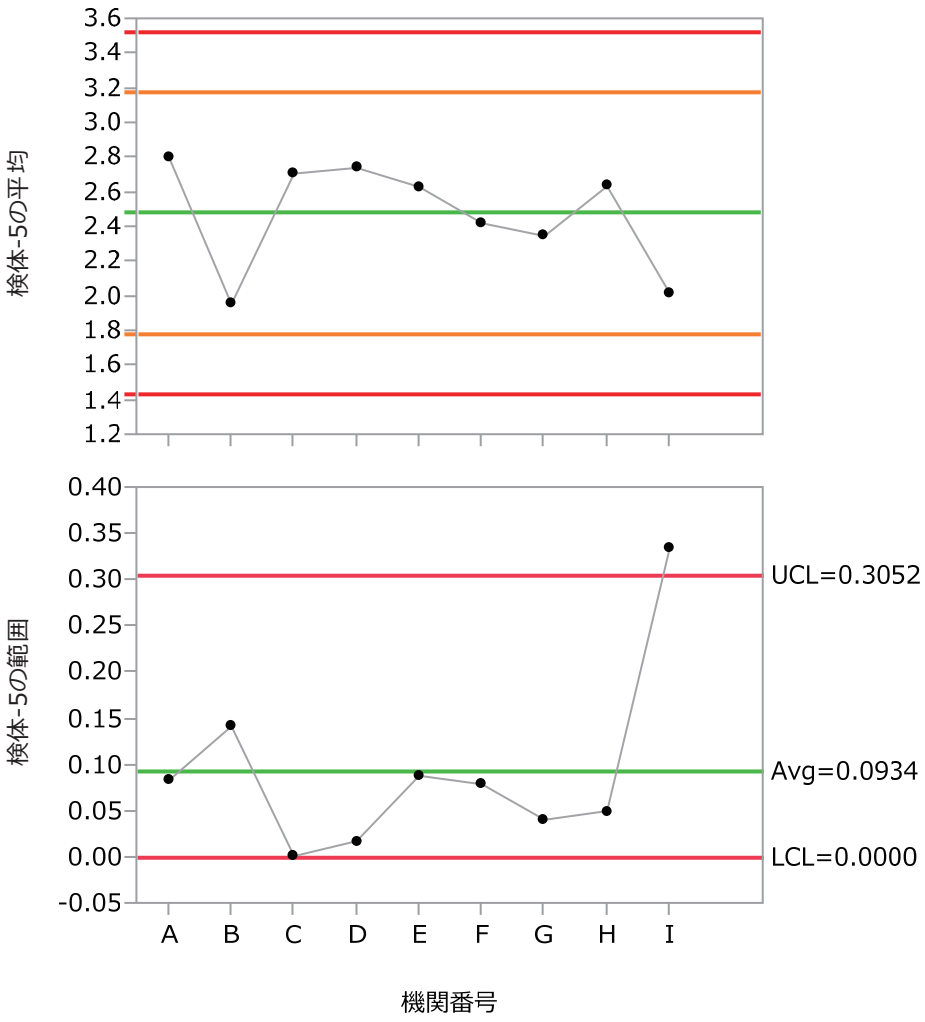


図12　検体−5におけるXbar−R管理図による評価(実測値)
Xbar管理図における管理限界線は｜ｚースコア｜=2および3とした。

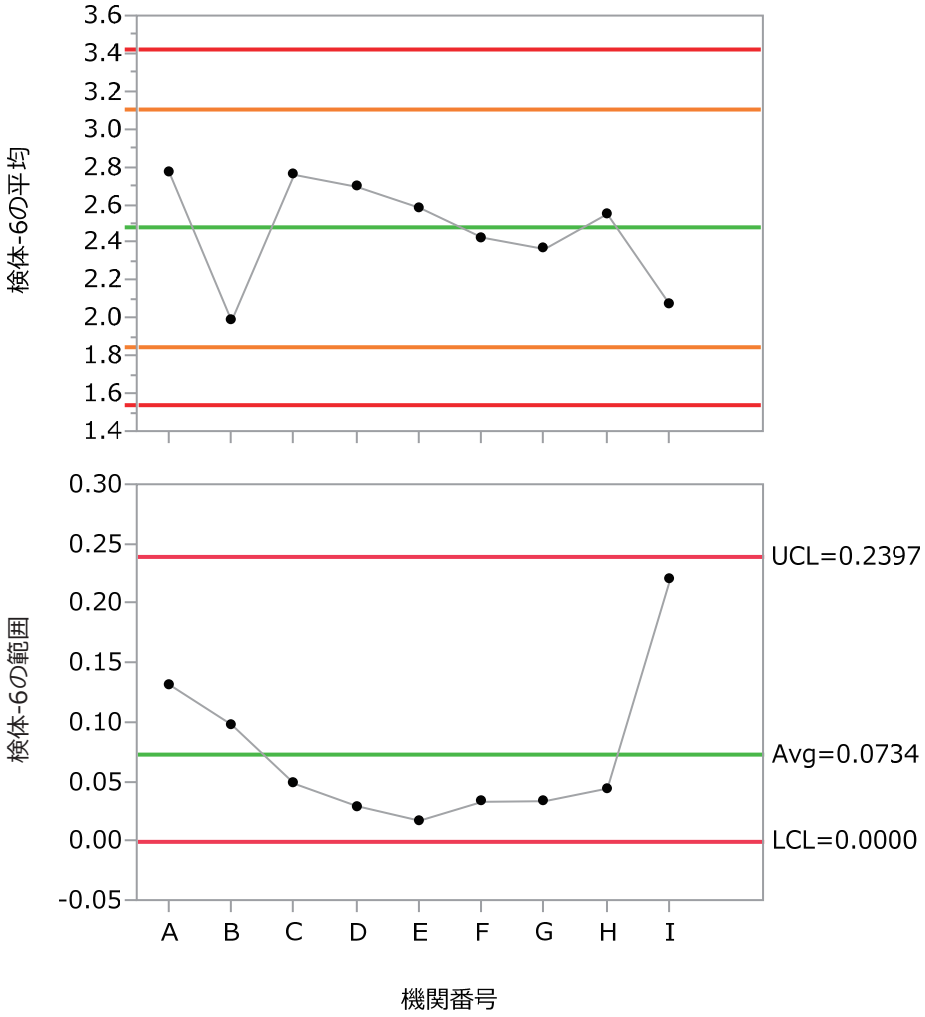


図13　検体−6におけるXbar−R管理図による評価(実測値)
Xbar管理図における管理限界線は｜ｚースコア｜=2および3とした。

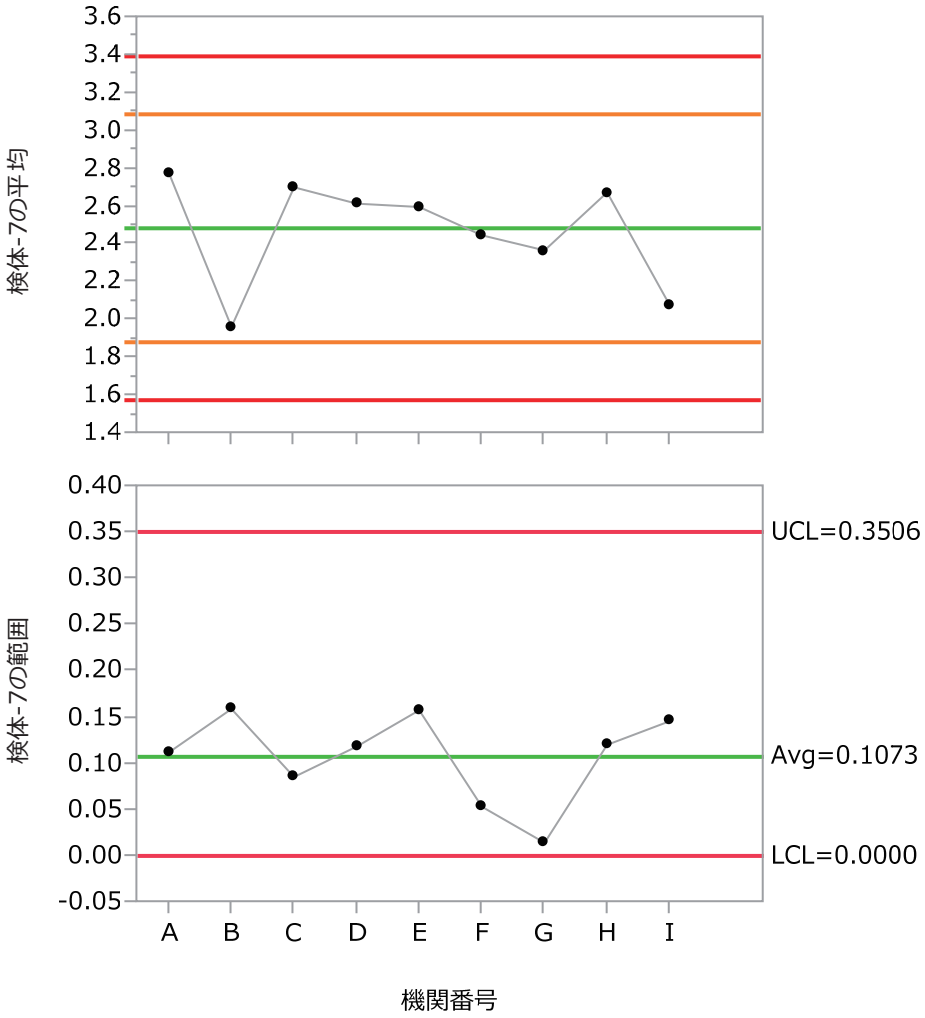


図14　検体-7におけるXbar-R管理図による評価(実測値)
Xbar管理図における管理限界線は｜zースコア｜=2および3とした。

平成 29 年度厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)
「ウイルスを原因とする食品媒介性疾患の制御に関する研究」
研究分担報告

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

研究分担者	上間　匡	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

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

A.　研究目的

現在さまざまなエタノール系消毒剤が市販され、ノロウイルス等のエンベロープを持たないウイルスに対しても、消毒・殺菌効果があるとするものも多く市販され、誰でも入手しやすい状況となっている。

これらのエタノール系消毒剤だけでなく、市販されるさまざまな消毒・殺菌剤のウイルス不活化効果については、国内での試験方法の標準化がされていないために、製造者等が独自に評価試験を行って

おり、データを示しているのが現状であり、標準的な試験方法の整備が課題となっている。

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

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

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

B. 研究方法

1. ウイルス

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

2. 細胞

HEp-2 細胞を感受性細胞として用いた。増殖培地には 5%FBS-DMEM、維持培地には 2%FBS-DMEM を用いた。

3. 消毒剤

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

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

次亜塩素酸ナトリウムは 50、100、200ppm に調整して使用した。

4. 不活化試験

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

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

5. 反応時間

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

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

(倫理面への配慮)

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

C. 結果

1. 局方エタノール(図 1)

6 回試験を実施し、反応時間 60 秒で速やかに 4$\log_{10}$程度不活化された。

2. 80%エタノール(図 2)

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

3. 次亜塩素酸ナトリウム(図3)

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

D. 考察

CB5は終濃度80%エタノール溶液によって直接不活化されることが示された。市販消毒剤には、有機酸やpH調節剤等が添加されているが、それらの添加物がなくても速やかに不活化されていた。

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

エタノールそのものに非常に高い感受性を示したことから、市販のエタノール系消毒剤に対しても、特にエタノール濃度が高い消毒剤に対して高い感受性を示すことが推察され、ウイルスの不活化試験の評価では、消毒剤の効果を過大に評価する可能性が示唆された。

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

E. まとめ

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

F. 研究発表

1. 論文発表：なし
2. 学会発表：なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

図 1：局方エタノールによる CB5 不活化効果(n=6)

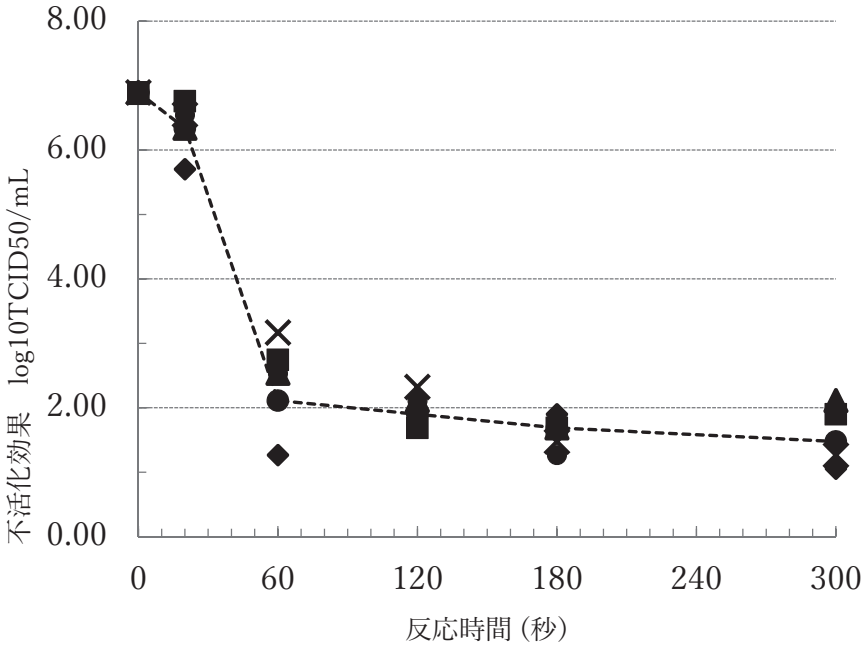


図 2：80%(ウイルス液と混合時)エタノールによる不活化効果(n=6)

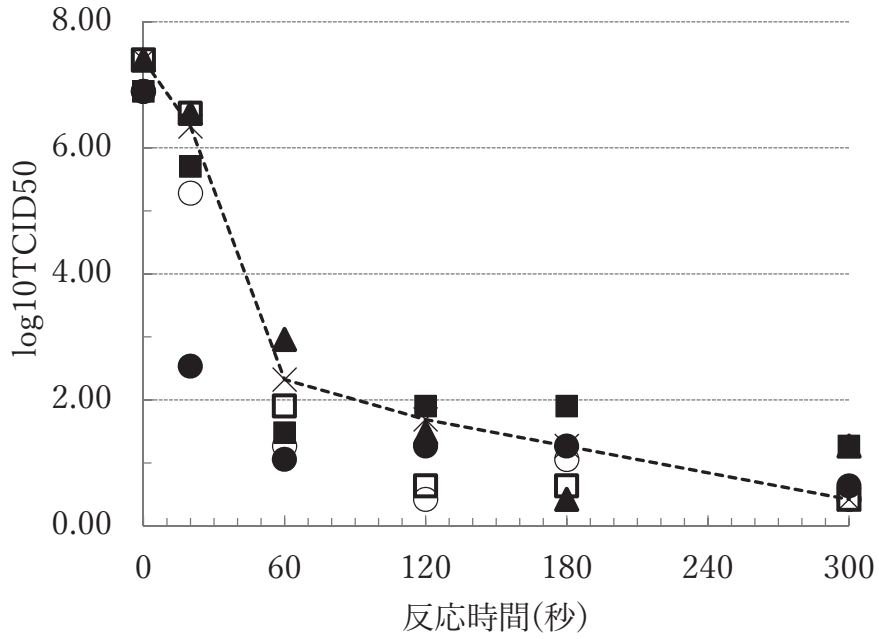
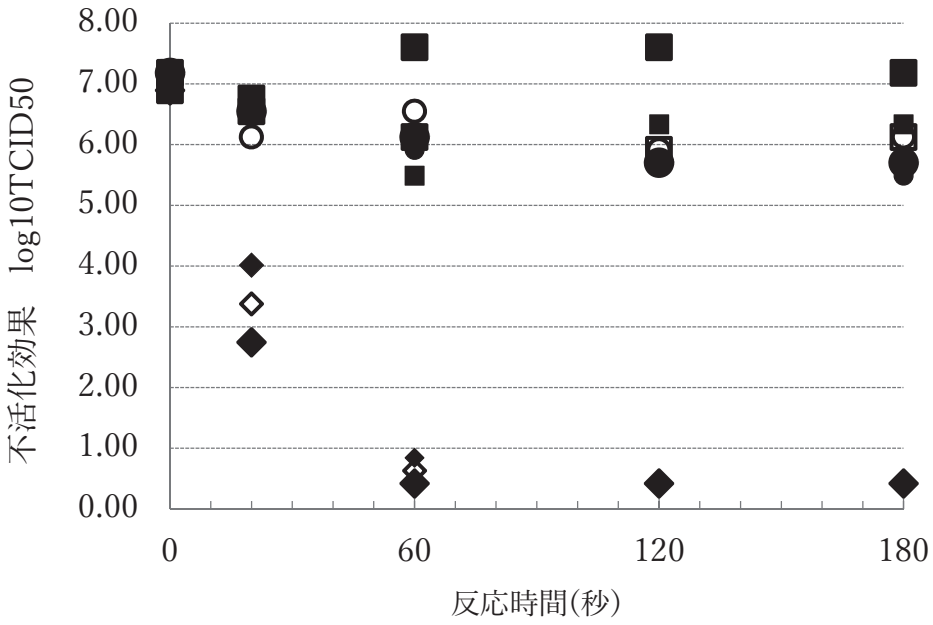


図 3：次亜塩素酸ナトリウムによる不活化効果（■50ppm, ●100ppm, ♦200ppm）



平成 29 年度厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)
「ウイルスを原因とする食品媒介性疾患の制御に関する研究」
研究分担報告

腸管系病原ウイルス培養細胞の探索に関する研究

研究分担者	上間　匡	国立医薬品食品衛生研究所
研究協力者	永田文宏	国立医薬品食品衛生研究所
研究協力者	高木弘隆	国立感染症研究所
研究協力者	野田　衛	国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

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

A. 研究目的

食品媒介性病原ウイルスのうちノロウイルス等の腸管病原性ウイルスには現在簡便で実用的な実験室内培養系が存在しない。そのため食品中でのウイルスの生存性や、消毒剤によるウイルスの殺菌効果を直接評価することが出来ず、培養細胞を用いた簡便な培養系の開発が求められている。

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

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

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

B. 研究方法

1. 細胞株

Caco-2 細胞、INT407 細胞、HT29/219 細胞を用いた。

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

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

HT29/219 細胞は増殖培地として 5%FBS-DMEM を使用した。

2. 胆汁成分

ウシ胆汁末(0.2%)、

ブタ胆汁末(0.2%)

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

マレイン酸 10mM、オレイン酸 10mM をストック溶液として用いた。

3. 培養方法

96 穴プレートに細胞を播種し、数日培養し、定着させる。定着後、培養上清を胆汁酸と混合した新鮮な培地にいれかえて 1 週間培養し、細胞の生存性を顕微鏡下で観察した。

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

(倫理面への配慮)

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

C. 結果と考察

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

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

D. まとめ

3 種類の腸管系細胞株について、胆汁成分などの至適添加量を決定した。

E. 研究発表

1. 論文発表：なし
2. 学会発表：なし

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

平成 29 年度厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)
「ウイルスを原因とする食品媒介性疾患の制御に関する研究」
研究分担報告

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

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

研究要旨

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

A.　研究目的

現在生食用カキの検査にはノロウイルス検査の通知法に記載されているリアルタイム PCR 法と nested PCR が主に使われている。迅速簡便なリアルタイム PCR は主にカキの出荷前の自主検査等に使用されているが，カキに含まれているノロウイルスは微量であるため陽性基準(実測値 10 未満)に満た

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

B. 研究方法

1. 材料

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

2. カキからのウイルスの回収，RNA抽出および逆転写反応

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

(1) リパーゼ溶液の調整法

リパーゼ(東京化成工業株式会社，LD0057)5gにPBS(-)20mlを加え，よく混和し，溶解後，10,000rpm，20分間遠心した。得られた遠心上清に等量のグリセロールを加え，使用時まで-20℃で凍結保存した。

(2) アミラーゼ溶液の調整法

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

(3) 簡便法の手順

ハサミで細切したカキの中腸腺0.3gを1.5mlチューブに入れ，PBS(-)700μlを加え，よく攪拌した。その後リパーゼ溶液10μlとネコカリシウイルス20μlを加え，37℃，45分間消化した後，10,000rpm，20分遠心した。遠心上清500μlを別の1.5mlチューブに移し，アミラーゼ溶液50μlを加え37℃，45分間消化した。その後4倍濃度PEG溶液220μlを加え，混和後10,000rpm，20分遠心した。遠心上清を除去し，0.5% Zwittergent in PBS(-)200μlに再浮遊させた後，その全量からHigh Pure Viral RNA Kit (Roche)を用いてRNA抽出を行った。抽出RNA50μlを用いて，ランダムプライマーにより逆転写反応を行いcDNAを合成した。

3. 1stPCRにおけるプライマー濃度の検討

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

10^1, 10^3コピー(実測値)になるように希釈したものを検体 DNA とした。その検体 DNA について 1stPCR のプライマー濃度を 0.5μM, 1μM, 2.5μM, 5μM, 7.5μM, 10μM として PCR 増幅を行い，その増幅産物をリアルタイム PCR で定量した。1stPCR の条件は 94℃5 分→[94℃30 秒→50℃30 秒→72℃1 分]×15 サイクル→72℃5 分とした。

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

4. 1stPCR に用いる DNA 合成酵素の検討

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

5. 低定量値が非特異増幅によるものかの確認

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

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

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

7. 混合プローブを用いた nested リアルタイム PCR の検討

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

(倫理面への配慮)

本研究では，特定の研究対象者は存在せず，倫理面への配慮は不要である。

C. 研究結果

1. 1stPCR におけるプライマー濃度の検討

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

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

2. 1stPCR に用いる DNA 合成酵素の検討

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

3. 低定量値が非特異的増幅によるものかの確認

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

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

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

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

ライマーやプローブを設計した。すなわち，nestedPCR の増幅産物の塩基配列をダイレクトシークエンス法で決定し，その塩基配列について blast 検索を行い，1stPCR の増幅領域(COG1F～G1SKR)より外側の塩基配列が登録されているものの中でスコアの一番高いものを基に COG1F～G1SK の外側にアニーリングするプライマーG1＋F5228，G1-R5754 を設計した(未発表)。次に G1＋F5228，G1-R5754 で PCR 増幅を行い，得られた PCR 断片(5228bp～5754bp)の塩基配列を決定し，COG1F，COG1R，G1SKR，RING1-TP-(a)，RING1-TP-(b)の各プライマーやプローブの配列と比較した。その結果，G1SKR，RING1-TP-(a)，RING1-TP-(b)の位置に配列が一致しない箇所が確認された(表 1)。そこで，検体中のノロウイルス RNA の塩基配列を基にプライマー及びプローブを設計し，それらを用いて nested リアルタイム PCR の定量値が改善されるかを調べた。予備実験においてプライマーを G1SKR から G1SKR-n に変更しても実測値に変化はみられなかった。一方，プローブを RING-TP-n に変更すると全てのカキ検体において有意な定量値の増加がみられた(表 2)。一方，ポジティブコントロールの定量値は逆に低下した。このことから，nested リアルタイム PCR において低定量値を示した原因は，リアルタイム PCR においてプローブのミスマッチによりみかけ上低く定量されていることが大きな原因の一つであることが示された。一方，RING-TP-n を使用すると，陽性コントロール DNA の定量値は低くなり，これもプローブの塩基配列とコントロール DNA の塩基配列のミスマッチによるものと考えられた。

5. 混合プローブを用いた nested リアルタイム PCR の検討

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

D. 考察

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

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

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

通知法[14]では 2003 年に設計されたプライマー及びプローブを使用しているが，今回使用した 2016 年に採取したカキに含まれているノロウイルス GⅠ.2，GⅠ.4 と塩基配列が合わなかったことから，通知法に記載されているプライマー及びプローブが近年のノロウイルスの配列に合わなくなってきている可能性がある。そのため将来的にノロウイルス GⅠだけでなく GⅡなどでもプライマー及びプローブが合わなくなる可能性があるため，定期的にノロウイルスの塩基配列をチェックし，適時プライマー及びプローブを改変していくことが，常に高感度にノロウイルスを検出するために必要である。

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

E. 結論

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

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

F. 研究発表

1. 論文発表：なし
2. 学会発表：なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

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

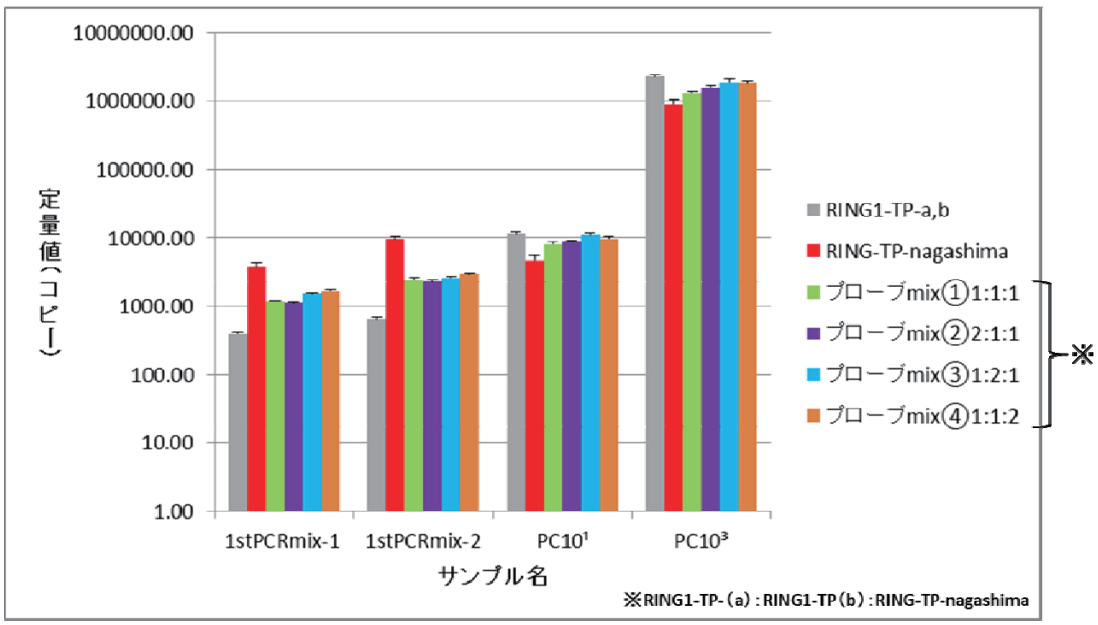
プライマー名 / サンプル番号	遺伝子型	G1SKR (CCA ACC CAR CCA TTR TAC A)	RING1-TP(a) (AGA TYG CGA TCY CCT GTC CA)	RING1-TP(b) (AGA TCG CGG TCT CCT GTC CA)
①	GⅠ.2	CCA ACC CAG CCA TTA TAC A	抽出エラー	抽出エラー
②	不明	抽出エラー	抽出エラー	抽出エラー
③	GⅠ.2	CCC ACC CAG CCA TTG TAC A	AGA TCG CAA TCT CCT GCC CG	AGA TCG CAA TCT CCT GCC CG
④	GⅠ.4	CCC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

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

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

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

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



平成 29 年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
分担研究報告

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

研究分担者　野田　衛　（国立医薬品食品衛生研究所）
研究協力者　米山　朋那（神奈川県厚木保健福祉事務所大和センター）
　　森口　真理子（神奈川県衛生研究所）

研究要旨

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

A．研究目的

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

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

一方，食品関係事業者の多くは下痢，嘔吐，発熱を日常の健康管理のためのチェック項目としており，このチェックでは，軽症

感染を含む非典型的な症状の感染例を捉えることは困難であると考えられる。

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

B．研究方法

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

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

C．研究結果

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

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

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

D．考察

従来，使用していた食中毒の調査票は，胃部の症状について，「げっぷ」，「吐気」，「嘔吐」が聞き取り項目になっていた。今回の調査では「吐気」が認められたのは有症者全体の 54%にとどまった。一方，上記の項目よりも細かい胃部の症状を聞き取り項目に加

えた結果，有症者全体の 88%に胃部の何らかの症状が認められ，聞き取り項目が「吐気」のみの場合と比較し，より多くの有症者を把握することができた。また，この結果からノロウイルス感染の症状の特徴として何らか胃部の異常が高頻度で起こることが推察された。

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

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

以上のように，ノロウイルス感染における症状は，典型的な下痢，嘔吐，発熱だけでなく，軽症例を含め症状には多様性があることが示された。一方，これらの症状を，①胃部の異常，②便性状の変化，③倦怠感など，大きなくくりでとらえるとそれらが高頻度で現れることが示唆された。これらのことから，従事者の健康チェックにおいては，①胃部の異常，②便性状の変化，③倦怠感など，幅広く症状を捉えるとともに，それらの詳細についても把握することが重要であると考えられる。そのことにより食品取扱施設においてノロウイルス感染者の把握がより的確に行われることになり，ノロウイルス食中毒予防に寄与すると考えられる。さらに，食中毒調査においても症状の詳細な聞き取りを行うことが，汚染要因の正確な把握に繋がるものと考えられる。

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

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

1. 下痢・嘔吐・発熱があった場合は出勤を控える。
2. 胃の不調，軟便程度の便性状の変化，微熱（平熱よりプラス 0.5℃），倦怠感などの症状があった場合は，以下に示す排便管理を行う。
3. 排便管理について

(1) 食品取扱い室等を汚染しないために職場のトイレで排便した場合は，速やかに上司に報告し，必要に応じて，食品を取り扱う作業に従事させない，帰宅させる，ノロウイルスの検査を受けさせる等の適切な対応をとる。

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

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

Ｅ．結論

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

Ｆ．健康危険情報

なし

Ｇ．研究発表

1.　論文発表

なし

2.　学会発表

平成 27 年度全国食品衛生監視員
研修会

Ｈ．知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3.その他

なし

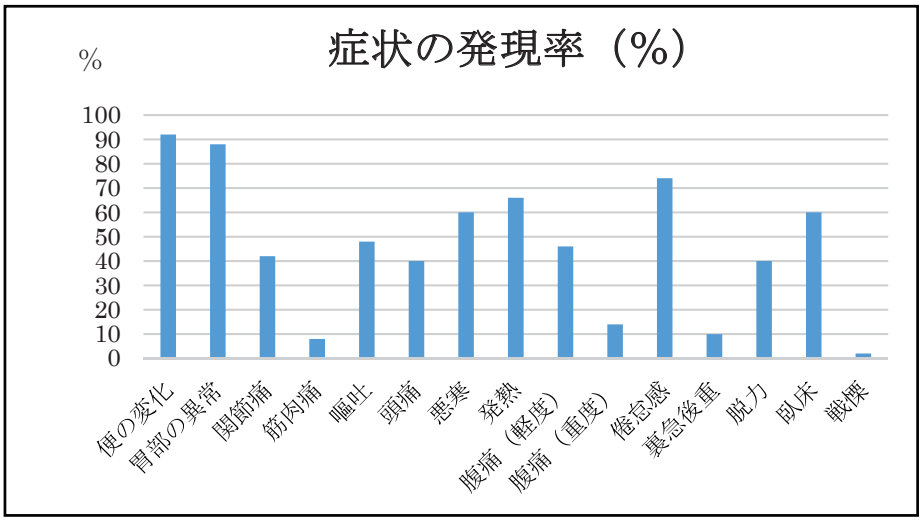


図１：症状の発現率（%）

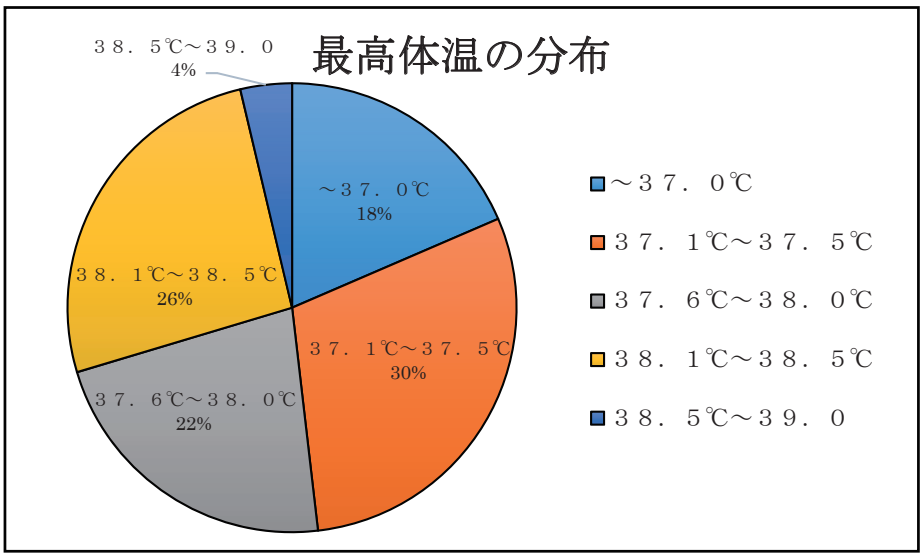


図２：最高体温の分布

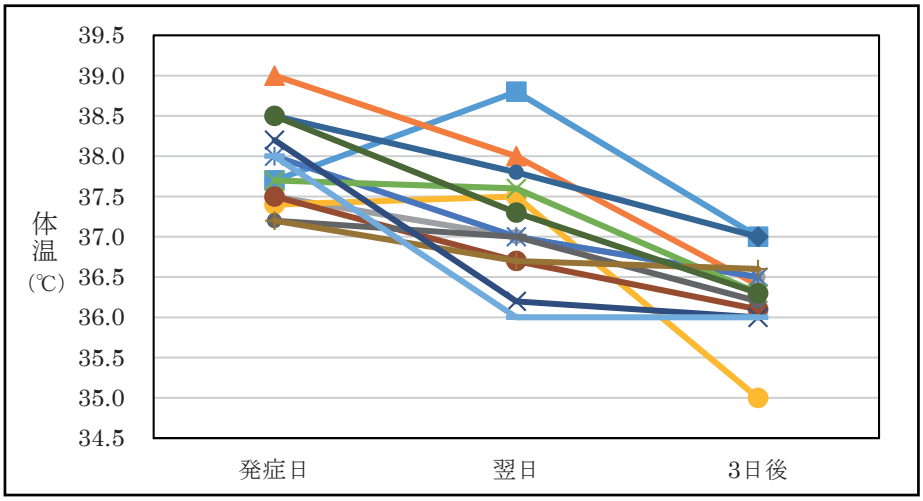


図３：発症日から３日後までの体温の経時変化

平成 29 年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
分担研究報告書

ノロウイルスの排便後の拡散の実証実験とその対策

研究分担者　野田　衛　（国立医薬品食品衛生研究所）
研究協力者　米山　朋那（神奈川県厚木保健福祉事務所大和センター）
　　森口　真理子（神奈川県衛生研究所）

研究要旨

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

A．研究目的

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

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

用が手指や衣服への二次汚染防止に有効であるかを検討した。

B．研究方法

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

実験１

(1)　長野県の実験 [2]を参考にし，下痢便時の臀部への飛沫の跳ね返り状況とこの状態で肛門部を清拭した手の汚染状態を青色のジェルネイル（マニキュアの一種で紫外線により硬化する爪化粧剤）を用いて再現した（写真１）。再現した手の状態のまま，再度，トイレットペーパーで肛門部を清拭し，衣服を整えた際の作業着の汚染状況を確認した。

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

実験２

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

実験３

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

C．研究結果

実験１

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

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

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

実験２

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

実験３

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

D．考察

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

レを使用している施設は 40%となっている。また，多くの食品取扱い施設は，学校給食の管理要領[4]で示されているような便器の前に手洗い設備があり身支度を整える前に手を洗える構造にはなっていない。今回の実験において作業着の腹部から下着の腹部に付着した汚染はその位置や青色ジェルネイルの濃淡から母指球の汚れに由来すると考えられた。この結果から排便後に肛門部を清拭し身支度を整える際に手を介して，衣服（下着を含む）に汚染が拡大する危険性があることが示唆された。さらに，トイレットペーパーで拭き取れなかった臀部の跳ね返りは下着の表面に浸透する可能性があることが分かった。これらのことから，感染者がトイレで排便した場合，ノロウイルスの汚染を防ぐことは極めて困難であると考えられる。このことから，食品取り扱い施設内においてトイレを使用する場合には，作業着の脱衣，靴の履き替え，手洗いの励行だけでは十分とは言えないと思われる。食品取り扱い施設において下痢などの症状がみられたら，まず，ノロウイルスによる胃腸炎である可能性を疑い，みずからが汚染を起こさないための対応を心がけることが重要である。致し方なく，下痢時に食品取り扱い施設内のトイレを使用する時は，可能な限り汚染防止に注意を払い排便し，用便後は，最大限に念入りな手洗いを心がけるとともに，作業着等が汚染した可能性がある場合などは，衣類を交換する。さらに，下痢をしたことを，施設の責任者に報告し，責任者は従業員が下痢をした場合，当該従業員に対し食品取り扱い作業の従事制限，ノロウイルス感染によるか否かの確認（医療機関等の受診）など適切な指導を行うとともに，トイレの清掃・消毒を速やかに実施するなどの汚染防止対策を徹底することが肝要である。

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

E．結論

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

参考文献

1. 平成 29 年 3 月 26 日開催の薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会食中毒部会資料 3
2. 高野穂高:長野県北信保健福祉事務所「トイレを起点とするノロウイルス汚染の拡大の検証」平成23年度全国食品衛生監視員研修会研究発表等抄録
3. 山本祥子:横浜市保健所食品衛生課食品衛生専門監視班「食品取扱者が着用するユニフォームの衛生点検について」平成 27 年度全国食品衛生監視員研修会研究発表等抄録

4. 文部科学省スポーツ青少年局学校健康教育課「学校給食調理従事者研修マニュアル」

F．健康危険情報

なし

G．研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

平成 29 年度全国食品衛生監視員研修会

H．知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

写真１：長野県の実験を参考にし、排便後の手の汚染を再現した。

写真２：作業着の上着前面右下の表面に汚染が認められた。

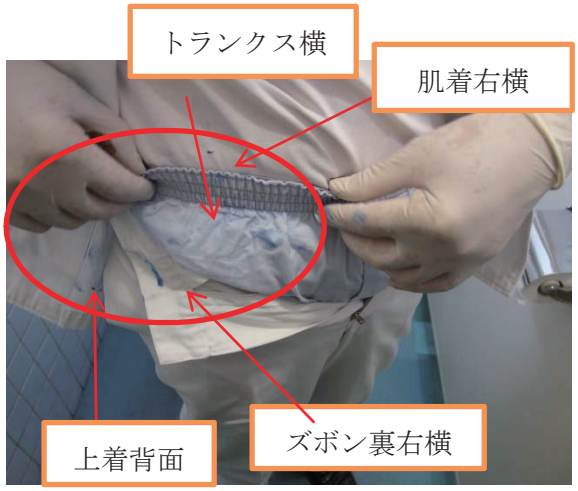


写真３：作業着の上着右側面下の表面に汚染が認められた。

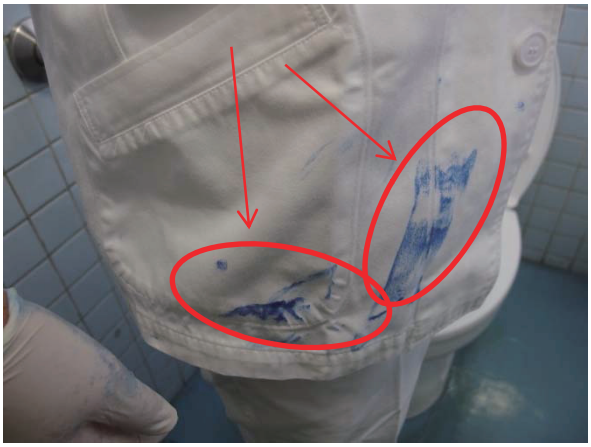


写真４：作業着上着背面右下　裏面に汚染が認められた。

写真５：下着（シャツ）の前面右の表面に汚染が認められた。

写真６：下着トランクス背面右側の表面に汚染が認められた。

写真７：汚染された作業着を着て調理時の調理台と汚染部位の位置関係を確認した

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

写真９：臀部の汚れが下着（トランクス）に浸透した。

写真１０：二重に装着した手袋を上の手袋だけ慎重に外した。

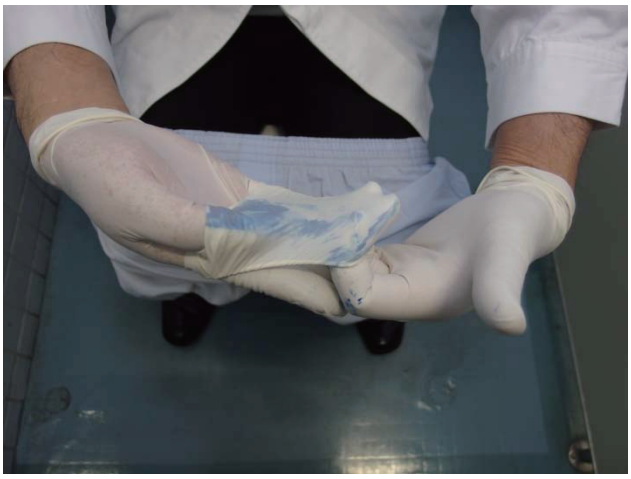


写真１１：着衣の汚染はみられなかった

平成 29 年度厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)
「ウイルスを原因とする食品媒介性疾患の制御に関する研究」
研究分担報告

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

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

研究要旨

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

A.　研究目的

2017 年 1 月から 2 月にかけて和歌山県御坊市，東京都立川市および小平市などで発生した食中毒事件は,1 つの海苔加工施設においてシート状の海苔を裁断機で刻む工程においてノロウイルス(NoV)に感染した作業者から汚染されたと推定される刻み海苔が原因食品であったことが示されている。この刻み海苔による分散型食中毒事件の発端となった和歌山県御坊市において，当所で原因食品として推定された学校給食の保存食について検査を実施した結果，磯和え 1 検体から NoV GⅡ.17 遺伝子が検出された。Real time PCR で得られた定量値から磯和えに含まれる NoV 遺伝子のコピー数は 1g あたり 125 コピーと推定された。本研究では，この値を基に喫食されたウイルス量および汚染源と推定された刻み海苔作業者の糞便中のウイルス量の推定を行った。

B.　研究方法

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

また，一人あたりの摂食量を 50g，汚染

が 1,000 食分と仮定し，磯和え全体の汚染ウイルス量を推定した。

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

(倫理面への配慮)

本研究では，特定の研究対象者は存在せず，倫理面への配慮は不要である。

C. 研究結果と考察

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

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

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

E. 結論

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

F. 研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表

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

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

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

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

平成 29 年度厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)
「ウイルスを原因とする食品媒介性疾患の制御に関する研究」
研究分担報告

手洗いの実施状況に関する検証について

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

研究要旨

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

A.　研究目的

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

B.　研究方法

某事業所から提供を受けた下記の各項目について集計した。

1. 手洗い前後の ATP 値の検証

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

2. 各種手洗い洗剤の比較

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

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

3. 継続的な手洗いの効果

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

(倫理面への配慮)

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

C. 研究結果と考察

1. 手洗い前後の ATP 値の検証

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

2. 各種手洗い洗剤の比較

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

3. 継続的な手洗いの効果の検証

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

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

D. 結論

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

E. 研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

表 1.　4 種類の手洗い洗剤による洗浄効果（ATP 値）および使用感の比較

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

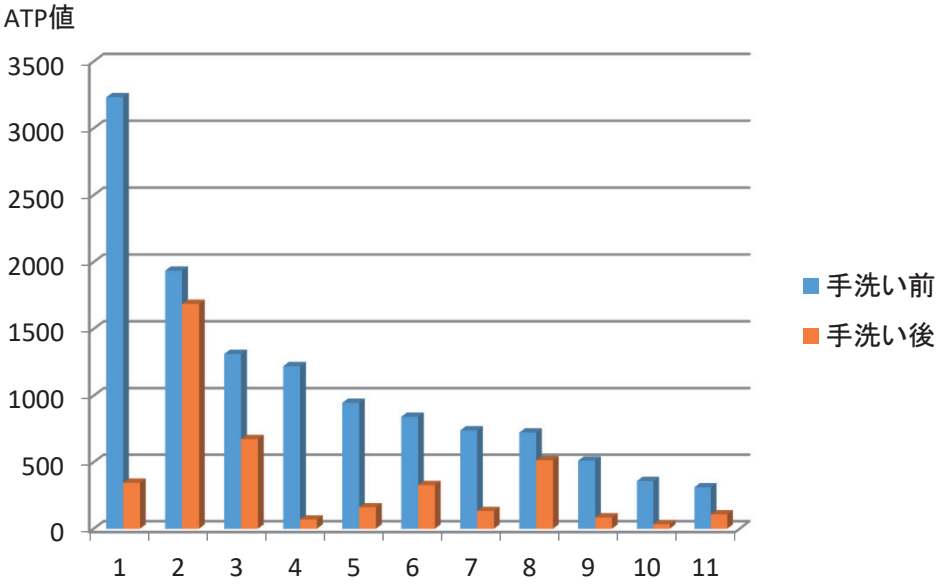
A：最初の手洗い後の ATP 値(従来の逆性石けん鹸（水石けん）使用)，B：A による手洗い後、「2 回目に使用した手洗い洗剤」で示した各手洗い洗剤（本文参照）で再度手洗いを実施した後の ATP 値

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

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

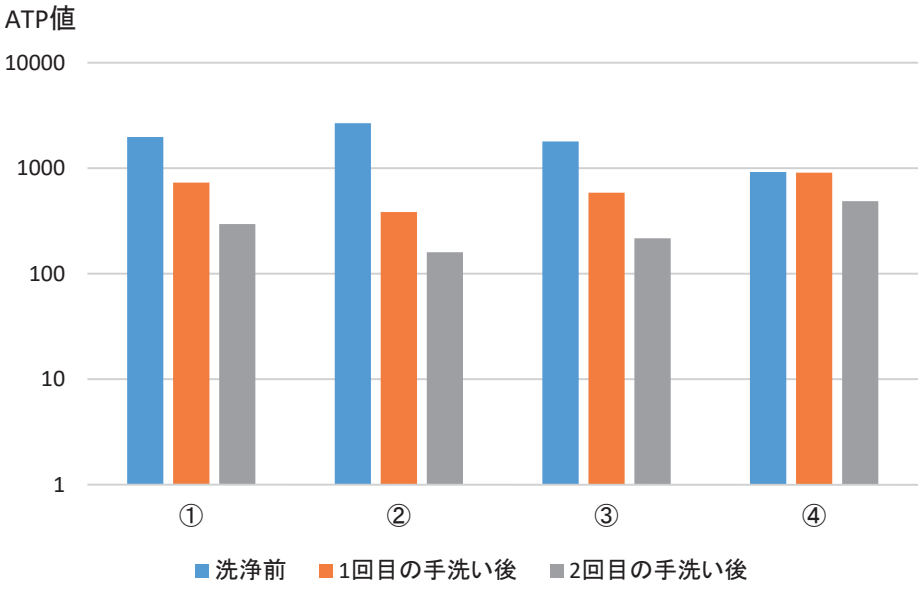
表 3.　月別の手洗い効果：手洗い後に ATP 値が 1,000 以上であった割合

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



既存の逆性石けんを使用した手洗いを11名で実施し、その手洗い前・後のATP値を示した。

図1. 手洗いによるATP値の変化



1回の手洗いは、既存の逆性石けんを使用し、その後、2回目の手洗いとして本文に示す①から④の各種手洗い洗剤を使用した実施し、洗浄前、1回目あるいは2回目の手洗い後のATP値を示した。値は10名の手洗いの算術平均値。

図2. 各種手洗い洗剤による効果の比較

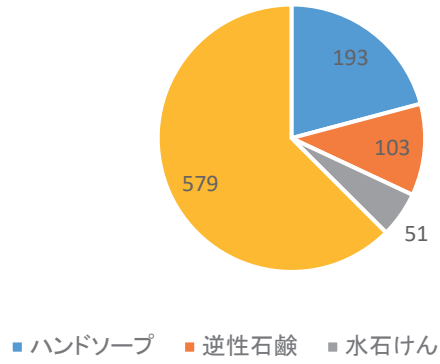


図3. 手洗いに使用されている手洗い洗剤の使用割合

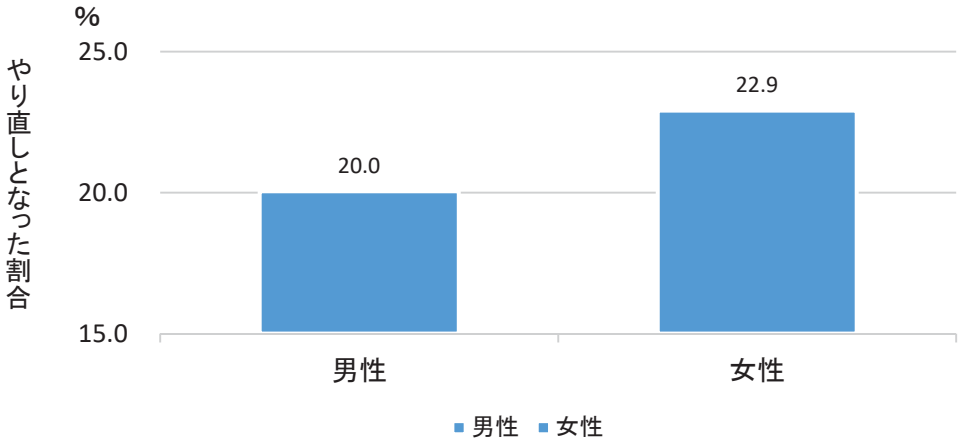


図4. 手洗いのやり直しの必要があった割合

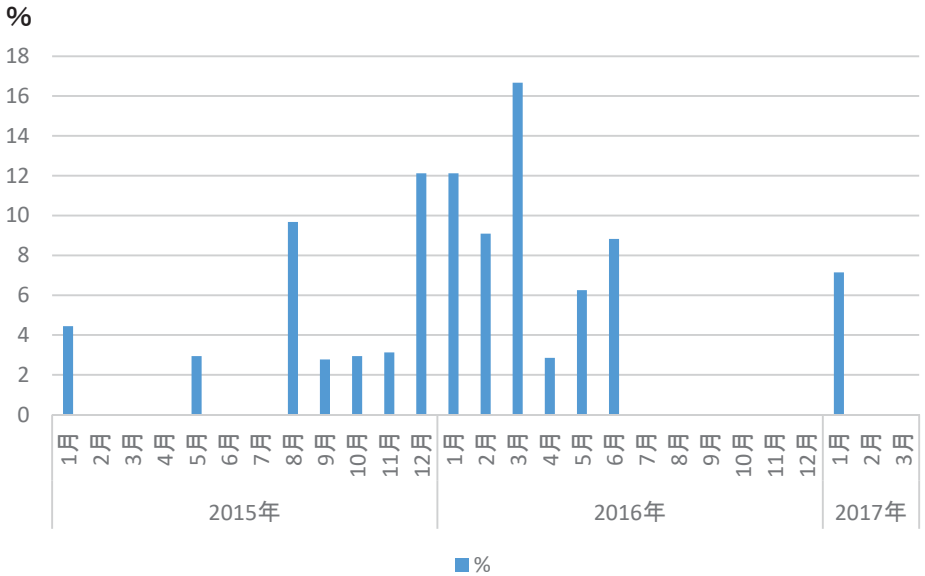


図5. 月別の手洗い後のATP値が1000以上であった割合

平成 29 年度厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)
「ウイルスを原因とする食品媒介性疾患の制御に関する研究」
研究協力報告

食中毒事例における調理従事者および患者由来ノロウイルスの遺伝子学的解析

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

北海道では、食中毒疑い事例の患者、調理従事者、食品等から検出されたノロウイルス遺伝子の塩基配列を比較し、一致するかどうかを確認している。比較には RT-PCR の検出用プライマー内の配列（RdRp 領域：約 290nt、RdRp-VP1 領域:約 340nt）を用いているが、この領域の配列の一致・不一致の情報を疫学調査による感染源等の判断の裏付けとして使用することが妥当であるかどうかを検証するため、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、食中毒事例内の検体の比較において、多くの事例では検出用プライマー内の配列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が、一部の事例において、検出用プライマー内の配列の比較結果では見えなかった不一致が多く検出された。また、検出用プライマー内の配列において 2 検体にそれぞれ異なる 1 塩基の不一致が確認されていた事例では、RdRp-VP1 全長の比較において 12 検体中 11 検体で合計 8 箇所の不一致が確認され、感染源のノロウイルスが単一ではなかった可能性が示唆された。

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。北海道における食中毒疑い事例の NoV 検査では、患者、調理従事者、食品等から検出された NoV 遺伝子について塩基配列を決定し、その一致・不一致の情報を感染源推定などに対する科学的根拠（疫学調査による判断の裏付け）として使用している。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、この領域の配列における一致・不一致情報の科学的根拠としての妥当性を検証するため、食中毒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

表 1 に示すとおり、北海道において 2013 年 4 月から 2017 年 12 月の間に発生した食中毒 11 事例を今回の調査の対象とした。これらの事例において、NoV 陽性となったすべての糞便検体を調査に用いた。二枚貝の喫食としては、事例 No.1, 4, 10 でホタテの刺身、事例 No.3 でホタテとホッキの寿司が提供されていた。いずれの事例も検出された NoV の遺伝子型は 1 種類であり、GII.Pe_GII.4 Sydney 2012（以下、GII.4）が 7 事例、GII.P17_GII.17（GII.17）が 2 事例、GII.P16_GII.2（GII.2）が 2 事例であった。

2. 方法

NoV 陽性の 108 検体について、10%便乳剤から RNA を抽出し、ORF3 の VP2 領域に設定したプライマーを用いて cDNA を合成した。これを鋳型として、RdRp 領域に設定された NV82 改変プライマー(1st)および P1 改変プライマー(nested)と、VP2 領域に設定した 2 種類のプライマーを用いて Nested PCR を行った。Nested PCR の増幅産物について、ダイレクトシークエンス法により塩基配列を決定した。今回の検討に使用する塩基配列は、P1 改変プライマーより下流の RdRp 領域から VP1 領域全長(以下、RdRp-VP1 全長)の 2,396nt（GII.4, GII.17）または 2,402nt（GII.2）とした。事例内で塩基配列を比較した際に不一致がみられた検体については、増幅過程でのエラーを考慮して再度 RNA 抽出からシークエンスまでを行い、不一致の再現を確認した上で結果を示した。

（倫理面への配慮）

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

C. 研究結果

調査に用いた 108 検体のうち、事例 No.5 の調理従事者(事後発症)および患者それぞれ 1 検体と事例 No.8 の調理従事者（事前発症）1 検体を除く 105 検体について、RdRp-VP1 全長の塩基配列情報を得ることができた。それぞれの事例内で検体間の配列を比較し、その結果を表 2 に示した。今回調査を実施した 11 事例のうち事例 No.10 を除く 10 事例は、食中毒調査の行政検査時に、調理従事者および患者から検出された NoV の塩基配列（検出プライマー内）がすべて一致することを確認していた。この 10 事例のうち 4 事例(事例 No.1, 2, 8, 11）は、RdRp-VP1 全長で比較しても塩基配列は 100%一致した。残る 6 事例と事例 No.10 では、配列の不一致が確認された。

塩基配列の不一致がみられた 7 事例について、配列の比較結果の詳細を図 1 に示した。今回の比較に用いた RdRp-VP1 全長の塩基配列は、図 1 の太矢印で示した領域のものである。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）、これらの領域は細矢印で示した。

事例 No.3, 4, 6, 9 の 4 事例は、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%一致したが、RdRp-VP1 全長の比較ではそれぞれ 1 検体に 1 塩基の不一致がみられた。不一致のみられた位置は、事例 No.3, 6, 9 は VP1 領域、事例 No.4 は RdRp 領域であった。これらの塩基の置換は、事例 No.4, 6 は同義置換、事例 No.3, 9 は非同義置換であった。

事例 No.7 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%一致したが、RdRp-VP1 全長の比較では 2 検体において VP1 領域にそれぞれ 1 塩基の不一致がみられた。患者 2 は C→T（同義）、患者 3 は C→T（非同義）の置換であった。

事例 No.5 も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%一致したが、RdRp-VP1 全長の比較では 3 検体において VP1 領域に合計 6 箇所の不一致が示された。調理従事者 2 は 3 塩基の不一致（T→Y、G→R、T→Y）であり、いずれも同義置換であった。患者 1 は 2 塩基の不一致 （G→A, T→Y）であり、いずれも非同義置換であった。患者 2 は 1 塩基の不一致（A→G）であり、同義置換であった。

事例 No.10 は、行政検査時の比較領域において、P1/P3 間（RdRp 領域）で患者 4 に 1 塩基、COG2F/G2-SKR 間（VP1 領域）で患者 8 に 1 塩基の不一致が確認されていた。RdRp-VP1 全長の比較では不一致箇所がさらに増加し、11 検体により合計 8 箇所の不一致が示された。患者 4 は P1/P3 間（RdRp 領域）の 1 塩基（T→C）の不一致のほか、VP1 領域にも 1 塩基（T→C）の不一致が確認された。患者 8 は COG2F/G2-SKR 間（VP1 領域）の 1 塩基（C→T）の不一致のみであった。行政検査時の比較領域では他の検体と 100%一致していた 10 検体のうち、RdRp-VP1 全長の比較では 9 検体において 1 または 2 塩基の不一致が確認された。調理従事者 1、患者 1, 2, 3, 11 の 5 検体は RdRp 領域の同じ場所の 1 塩基に不一致（A→G または R）がみられた。患者 6, 7 の 2 検体も VP1 領域の同じ場所の 1 塩基に不一致（C→T または Y）がみられた。患者 5 は、患者 6, 7 と同じ場所（C→T）に加え、VP1 領域の別の 1 箇所に A→R の不一致が見られた。患者 9 は、VP1 領域に 2 塩基（A→G、C→M）の不一致が確認された。

D. 考察

行政検査時の検出用プライマー内の塩基配列の比較において全検体で配列が一致することを確認していた 10 事例のうち、4 事例は RdRp-VP1 全長の配列も全検体で 100%一致し、4 事例は 1 検体で 1 箇所の不一致が確認されたのみであった。このことから、食中毒事例内の検体の比較において、多くの事例では 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。その一方で、事例 No.5 では、検出用プライマー内の配列は全検体で 100%一致するものの、RdRp-VP1 領域のより長い配列の比較では 3 検体により合計 6 箇所の不一致が示された。このように、検出用プライマ

一内の配列の比較結果では見えなかった不一致が多く検出される事例もあることから、食中毒検査におけるウイルス遺伝子解析の解釈および利用方法について検討するため、今後もデータの集積が必要である。

また、行政検査時の検出用プライマー内の配列の比較により 2 検体にそれぞれ 1 塩基の不一致が確認されていた事例 No.10 では、RdRp-VP1 全長の比較においてさらに多くの不一致が確認され、感染源の NoV が単一ではなかった可能性が示唆された。図 1 に示すように、塩基配列の不一致がみられる位置は偏りがなく不規則であることから、感染後の変異が解析長の短い行政検査時の検出用プライマー内の位置で生じる確率はあまり高くないと考えられる。そのため、検出プライマー内の配列において複数検体または複数箇所で不一致が認められる事例では、感染源が単一ではない可能性を考慮して疫学調査における確認を行い、場合によってはより長い配列の比較を検討する必要があると考えられた。

E. 結論

NoV による食中毒事例において、多くの事例では NoV 検出用プライマー内の短い塩基配列情報を用いた比較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ていないと考えられたが、一部、検出用プライマー内の配列の比較結果では見えなかった不一致が多く検出された事例もあったことから、さらにデータを集積し比較検討を行う。

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　対象とした食中毒事例と NoV 陽性検体の内訳

事例 No.	発生 年/月	原因施設	PCR検査結果 （NoV陽性数／検査数）					検出NoVの遺伝子型
			原因施設				患者	
			調理従事者			配膳など		
			事前発症※1	事後発症※2	症状なし			
1	2013/ 4	飲食店	−	1/1	2/2	−	9/10	GII.Pe_GII.4 Sydney 2012
2	2013/ 5	食堂	1/1	−	1/2	−	9/11	GII.Pe_GII.4 Sydney 2012
3	2013/12	飲食店	1/1	−	2/6	−	10/11	GII.Pe_GII.4 Sydney 2012
4	2014/ 3	飲食店	1/1	1/2	1/4	0/5	6/7	GII.Pe_GII.4 Sydney 2012
5	2014/ 3	飲食店	1/1	3/3	0/1	−	5/6	GII.Pe_GII.4 Sydney 2012
6	2015/ 3	飲食店	1/1	−	0/4	0/3	10/10	GII.P17_GII.17
7	2015/ 4	飲食店	−	−	2/3	−	6/6	GII.Pe_GII.4 Sydney 2012
8	2016/ 3	飲食店	2/2	−	1/2	−	7/9	GII.Pe_GII.4 Sydney 2012
9	2017/ 2	飲食店	−	−	1/1	0/1	4/4	GII.P16_GII.2
10	2017/ 3	飲食店	−	−	1/4	−	11/12	GII.P16_GII.2
11	2017/ 12	飲食店	−	2/2	1/1	−	5/5	GII.P17_GII.17

※１：原因となった食事の調理日以前に発症

※２：原因となった食事の調理日より後に発症

表２　各事例における塩基配列の一致・不一致状況

事例 No.	塩基配列の比較を行った検体数				塩基配列の一致･不一致状況（不一致のみられた検体）
	調理従事者			患者	
	事前発症	事後発症	症状なし		
1		1	2	9	すべて一致
2	1		1	9	すべて一致
3	1		2	10	1箇所の不一致（調理/症状なし;1検体）
4	1	1	1	6	1箇所の不一致（調理/症状なし;1検体）
5	1	2		4	6箇所の不一致（調理/事後発症;1検体、患者;2検体）
6	1			10	1箇所の不一致（患者;1検体）
7			2	6	2箇所の不一致（患者;2検体）
8	1		1	7	すべて一致
9			1	4	1箇所の不一致（調理/症状なし;1検体）
10			1	11	8箇所の不一致（調理/症状なし;1検体、患者;10検体）
11		2	1	5	すべて一致

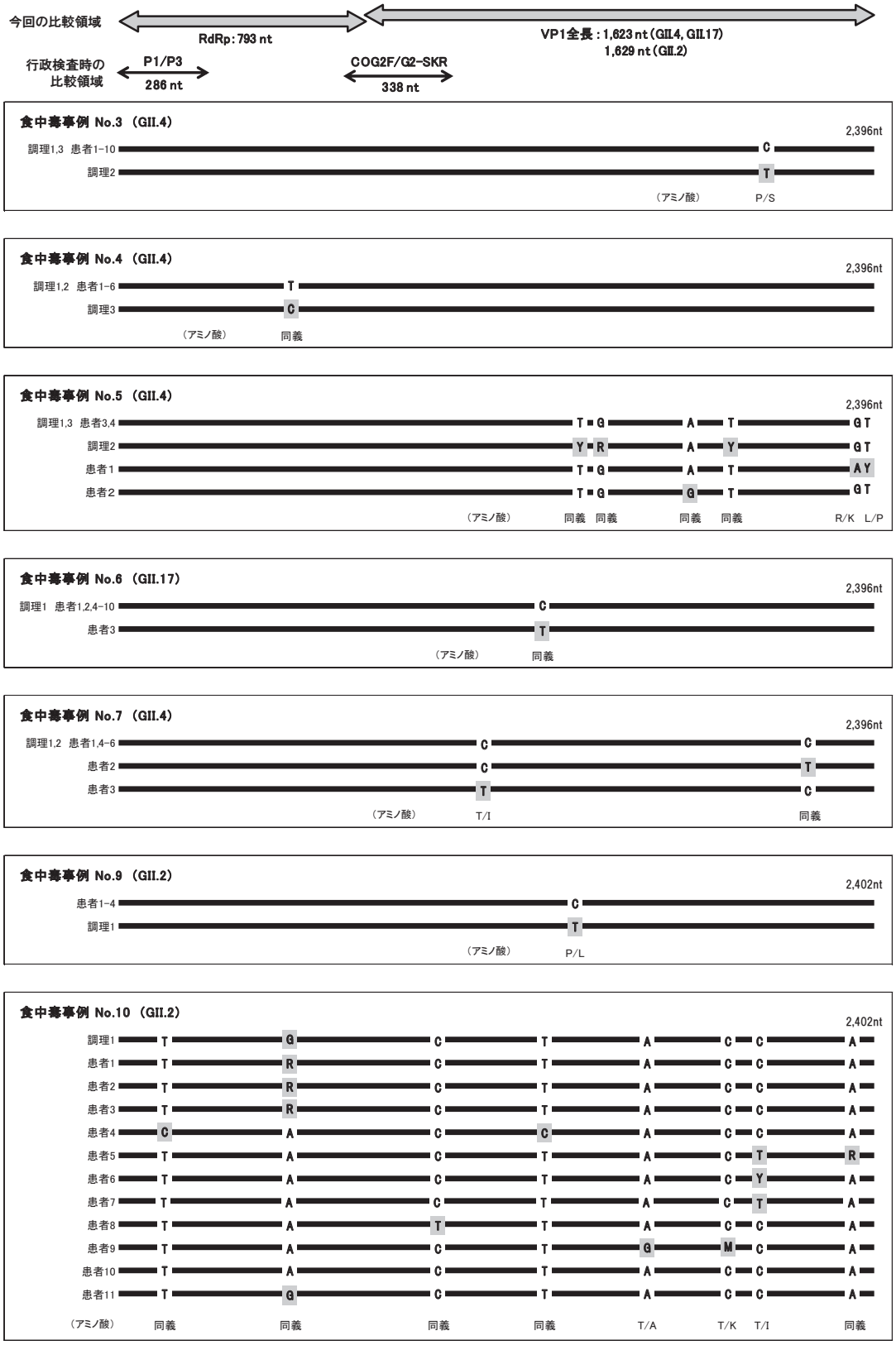


図１．塩基配列の不一致がみられた事例についての比較結果の詳細

平成 29 年度厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)
「ウイルスを原因とする食品媒介性疾患の制御に関する研究」
研究協力報告

青森県における集団胃腸炎事例から検出されたノロウイルスの分子疫学解析（2012/13～2016/17 シーズン）

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
研究協力者	筒井　理華	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

2012 年 9 月～2017 年 8 月（2012/13～2016/17 シーズン）に青森県内で発生した集団胃腸炎事例の内、調理従事者からノロウイルスが検出された食中毒 14 事例の遺伝子解析を行った。その結果、11 事例（事例番号 2、8 および 12 を除く）の調理従事者由来株と発症者等由来株の塩基配列の相同性は 100%であった。事例番号 2 では、GI.6 が検出された 2 株は 7 塩基異なり、GII.4 Sydney_2012 が検出された 6 株のうち 1 株が 1 塩基異なっていた。GII.17 が検出された事例番号 8 では 21 株のうち 4 株、事例番号 12 では 23 株のうち 2 株が 1 塩基ずつ異なり、事例番号 12 ではアミノ酸置換が見られた。遺伝学的な変異かどうかの解釈については、より長い領域の遺伝子解析や更なるデータの蓄積が必要である。

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として重要である。過去の NoV 食中毒の調査結果から、ウイルスに感染した調理従事者等を介して食品が汚染されたことが原因となっているケースが多くを占めている。一方、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)]。

調理従事者が関与する食中毒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科学的根拠となる[1)]。一方、発症者と調理従事者等から検出された NoV のシークエンス解析の結果、同じ遺伝子型の NoV が検出される場合、多くの事例では塩基配列が一致するが、一部の事例で塩基配列が一致しない事例が認められる場合がある。

今回、2012/13～2016/17 シーズンに青森県内で発生した NoV による集団胃腸炎事例の内、調理従事者から NoV が検出さ

れた食中毒事例について、分子疫学的に検討したので報告する。

B. 研究方法

1. 材料

2012/13～2016/17 シーズンに青森県内で発生した集団胃腸炎事例の内、調理従事者から NoV が検出された食中毒 14 事例 520 検体(ふん便 332、吐物 6、拭取り 155、食品 27) を用いた (表 1)。

なお、感染地が県外であると推定される事例は除いた。

2. ウイルス RNA の抽出・cDNA 合成・NoV 遺伝子の検出 (リアルタイム PCR 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(Qiagen) で精製し、BigDye Terminator Kit (Thermo) でシークエンス反応後、DNA シークエンサー ABI PRISM310 (Applied Biosystems)、Applied Biosystems® 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用い DNA ダイレクトシークエンス解析法により NoV Capsid N/S 領域の塩基配列を決定した (GI：260nt、GII：279nt)。得られた塩基配列を塩基配列解析ソフトウェア Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) version6 [2] 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] に記載された株を使用した。

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

C. 研究結果

2012/13～2016/17 シーズンに青森県内で発生し、調理従事者から NoV が検出された食中毒 14 事例の概要を表 1 に示した。行政的には、14 事例すべて NoV GII による食中毒と判断された。14 事例において、調理従事者、発症者および非発症者等から採取された糞便 (陽性数/検体数：203/332)、吐物 (2/6)、拭取り (6/155) から NoV 遺伝子が検出されたが、食品 (0/27) からは検出されなかった。遺伝子群別で見ると、事例番号 2 は GI および GII の両遺伝子群が検出され、それ以外の 13 事例は GII のみが検出された。

14 事例について NoV 陽性検体の遺伝子解析を行った(表 2)。GI は 260nt、GII は 279nt の領域について、事例ごとに同じ遺伝子型の調理従事者から検出された NoV とそれ以外の検体から検出された NoV の塩基配列を比較した。その結果、11 事例 (事例番号 2、8 および 12 を除く) において、同一事例のうち同じ遺伝子型の NoV 遺伝子の相同性は 100%であった。事例番号 2 において、GI.6 が調理従事者から 1 株、発症者から 1 株検出されたが、両者の配列は 7 塩基異なり(C98T、A107G、A131C、G137A、C188T、C230T、A251G)、相同性は 97.3%であった。GI.6 のアミノ酸配列 (85aa) を比較した結果、①と②の間にアミノ酸置換は見られなかった。また、

GII.4 Sydney_2012 が調理従事者から 1 株、発症者から 6 株検出されたが、発症者由来の 1 株は 1 塩基異なり（A135G)、相同性は 99.6%であった。GII.4 Sydney_2012 のアミノ酸配列（93aa）を比較した結果、①と②の間にアミノ酸置換は見られなかった。事例番号 8 において、GII.17 が調理従事者から 2 株、発症者から 18 株、吐物から 1 株検出されたが、発症者由来の 4 株は 1 塩基異なり(C138T)、相同性は 99.6%であった。GII.17 のアミノ酸配列を比較した結果、①と②の間にアミノ酸置換は見られなかった。事例番号 12 において、GII.17 が調理従事者から 4 株、発症者から 19 株検出されたが、発症者由来の 2 株は異なる箇所で 1 塩基ずつ異なり（②：T183A、③：T234C)、相同性は 99.6%であった。GII.17 のアミノ酸配列を比較した結果、①と③の間にアミノ酸置換は見られなかったが、②は 61 番目のアスパラギンがリシンに置換していた（N61K)。

14 事例から検出された NoV の遺伝子のカプシド N/S 領域の ML 法による系統樹を図 1（GI)、図 2（GII）に示した。配列名には、事例番号、遺伝子型の他に、調理従事者・発症者・吐物・拭取りの塩基配列が一致した株数を記載した。系統樹解析の結果、事例番号 1、2、3、5、6、7、10 および 11 で検出された GII.4 は、すべて Sydney_2012 と同じクラスターに分類された。また、事例番号 4、8、9 および 12 から検出された GII.17 は、2014 年以降の川崎類似株であったが、事例番号 5 から検出された GII.17 は、それ以前に検出されていた別系統のものであった。

D. 考察

2012/13～2016/17 シーズンに青森県内で発生した集団胃腸炎事例の内、調理従事者から NoV が検出された食中毒事例は 14 事例であり、すべて NoV GII による食中毒と判断されていた。事例番号 2、8 および 12 を除く 11 事例において、発症者等由来株はすべて調理従事者由来株と塩基配列（279nt）が一致したため、食中毒と判断するための有力な根拠であったと推察された。

事例番号 2 は、調理従事者由来 1 株と発症者由来 5 株（GII.4 Sydney_2012①）の相同性が 100%であり、行政判断に有用なデータであったと推察された。一方、発症者由来 1 株（GII.4 Sydney_2012②）は、135 番目の A が C になっていた。①と②の間にアミノ酸置換は見られず、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考えられる。また、調理従事者のみから検出された遺伝子型（GI.6①、GI.7、GII.2)、発症者のみから検出された遺伝子型（GI.6②、GI.9）もあり、様々な病原体が関与した事例であった。GI.6①と②の間にアミノ酸置換はなかったため、宿主側による影響か感染源による影響、また遺伝子の増幅過程で増幅しやすい遺伝子による影響か明らかにできなかった。

事例番号 8 は、調理従事者由来 2 株と発症者由来 14 株と吐物由来 1 株（GII.17①）の相同性が 100%であり、行政判断に有用なデータであったと推察された。一方、発症者由来 4 株（GII.17②）は、138 番目の C が T になっていた。①と②の間

にアミノ酸置換は見られず、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考えられる。

事例番号12は、調理従事者由来4株と発症者由来17株（GII.17①）の相同性が100%であり、行政判断に有用なデータであったと推察された。一方、発症者由来1株GII.17②は183番目のTがA、発症者由来1株GII.17③は234番目のTがCになっていた。①と③の間にアミノ酸置換は見られなかったが、②では置換が見られた。②のシークエンス解析データを詳細に解析したところ、わずかではあるが、Aの波形の下にTの波形があり、宿主側の影響や遺伝子の増幅過程でAの方が増幅しやすかった可能性もある。遺伝学的な変異について断言するには、今後もデータを蓄積し、解析していく必要がある。

同一事例内で、同じ遺伝子型でも数塩基異なる検体が見られた。異なる病原体が感染した場合、感染後に遺伝学的な変異が発生した場合、PCRやシークエンス反応において塩基の読み違いを起こした場合など、様々な可能性があるので、食中毒の判断・詳細な把握のためには、今後も引き続きデータを蓄積し、解析していく必要がある。また、今回はCapsid領域の300塩基程度の解析であるため、NoVの詳細な動向の把握には、ポリメラーゼ領域も含めたより長い領域の解析が必要となる。

E. 結論

1. 調理従事者からNoVが検出された食中毒事例は14事例であった。
2. 11事例（事例番号2、8および12を除く）の調理従事者由来株と発症者等由来株の塩基配列の相同性は100%であった。
3. 事例番号2では、7塩基異なるGI.6、1塩基異なるGII.4 Sydney_2012が検出された。
4. 事例番号8および12では、1塩基ずつ異なるGII.17が検出された。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

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., Filipski, 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)

表１　青森県内における調理従事者から NoV が検出された食中毒事例
（2012/13～2016/17 シーズン）

シーズン	事例番号	発生日	原因施設	摂食場所	遺伝子群	遺伝子型	ふん便				吐物		拭取り		食品	
							調理従事者		発症者ほか							
							陽性数	検査数	陽性数	検査数	陽性数	検査数	陽性数	検査数	陽性数	検査数
2012/13	1	H25.1.18	飲食店	飲食店	NoV GII	GII.4	2	7	8	8			0	10		
	2	H25.1.24	飲食店	飲食店	NoV GI	GI.6、GI.7、GI.9	3	7	10	11			0	13		
					NoV GII	GII.2、GII.4										
	3	H25.3.25	ホテル	ホテル	NoV GII	GII.4	1	4	12	12			0	14	0	6
	4	H25.4.11	飲食店	事業所	NoV GII	GII.17	2	2	3	3			0	10		
2013/14	5	H25.12.14	ホテル	ホテル	NoV GII	GII.4、GII.17	3	28	22	25			4	17		
	6	H26.1.15	飲食店	事業所	NoV GII	GII.4	1	6	25	26	1	5	1	13		
	7	H26.5.15	給食施設	給食施設	NoV GII	GII.4	3	9	4	4			0	5	0	7
2014/15	8	H26.12.31	飲食店	家庭	NoV GII	GII.17	2	3	18	21	1	1	0	13		
	9	H27.2.9	飲食店	学校	NoV GII	GII.13、GII.17	3	16	13	14			0	6		
	10	H27.2.12	給食施設	給食施設	NoV GII	GII.4	3	4	7	7			0	6	0	9
2015/16	11	H28.2.6	飲食店	飲食店	NoV GII	GII.4	1	2	6	6			0	11		
	12	H28.3.19	飲食店	飲食店	NoV GII	GII.17	4	13	19	30			0	5	0	1
2016/17	13	H28.12.10	飲食店	飲食店	NoV GII	GII NT、GII.2	1	6	20	30			1	13		
	14	H28.12.19	飲食店	飲食店	NoV GII	GII.2	1	22	6	6			0	19	0	4
計							30	129	173	203	2	6	6	155	0	27

表２　食中毒事例において検出された NoV 遺伝子型の内訳

シーズン	事例番号	発生日	遺伝子型		ふん便		吐物	拭取り	相同性
					調理従事者	発症者ほか			
2012/13	1	H25.1.18	GII NT			1			－
			GII.4 Sydney_2012		2	7			100%
	2	H25.1.24	GI.6	①	1				97.3%
				②		1			
			GI.7		1				－
			GI.9			1			－
			GII NT			2			－
			GII.2		1				－
			GII.4 Sydney_2012	①	1	5			99.6%
				②		1			
	3	H25.3.25	GII.4 Sydney_2012		1	12			100%
	4	H25.4.11	GII.17		2	3			100%
2013/14	5	H25.12.14	GII.4 Sydney_2012		2	22		4	100%
			GII.17		1				－
	6	H26.1.15	GII.4 Sydney_2012		1	25	1	1	100%
	7	H26.5.15	GII NT			1			－
			GII.4 Sydney_2012		3	3			100%
2014/15	8	H26.12.31	GII.17	①	2	14	1		99.6%
				②		4			
	9	H27.2.9	GII.13		2	13			100%
			GII.17		1				－
	10	H27.2.12	GII.4 Sydney_2012		3	7			100%
2015/16	11	H28.2.6	GII.4 Sydney_2012		1	6			100%
	12	H28.3.19	GII.17	①	4	17			99.6%
				②		1			
				③		1			
2016/17	13	H28.12.10	GII NT			1			－
			GII.2		1	19		1	100%
	14	H28.12.19	GII.2		1	6			100%

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

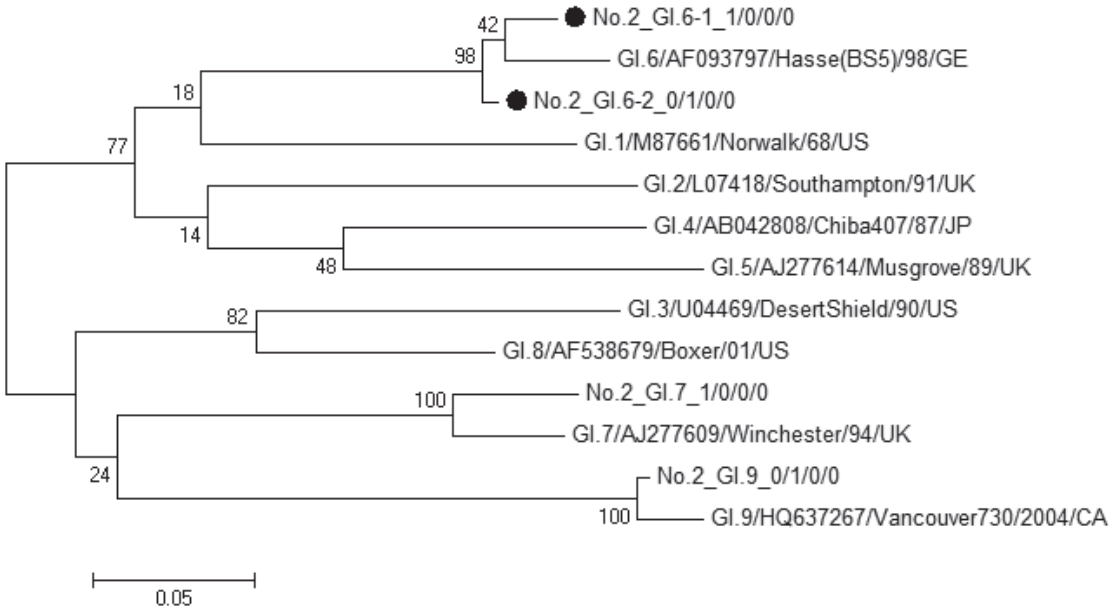


図１　食中毒事例から検出された NoV GI の系統樹（260nt）

配列名：事例番号_遺伝子型_調理従事者数/発症者数/吐物数/拭取り数

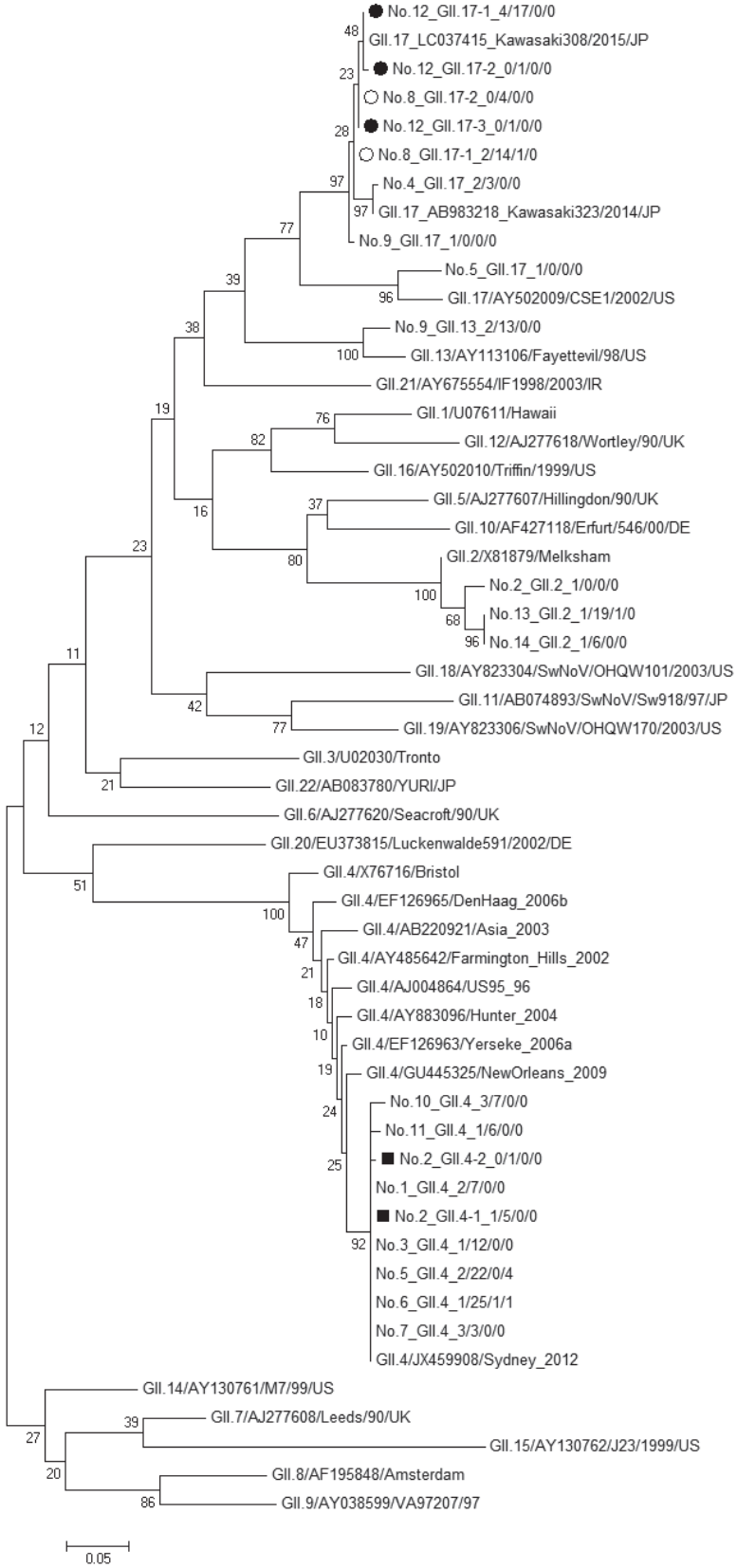


図２　食中毒事例から検出された NoV GII の系統樹（279nt）

平成 29 年度厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)
「ウイルスを原因とする食品媒介性疾患の制御に関する研究」
研究協力報告

岩手県におけるノロウイルスの発生動向について

研究協力者　高橋　知子　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

研究要旨

岩手県のノロウイルスによる集団発生は、2014／15、2015／16 シーズンの GⅡ.4 と GⅡ.17 の流行や、2016／17 シーズンの GⅡ.2 による大流行において他県と同様の傾向であった。GⅡ.4 の流行の大きさは、シーズンにより異なるが、毎年、恒常的に流行が見られた。保育園で検出される遺伝子型等の多様性は、免疫の低い低年齢層の集団に、周囲に存在する様々な遺伝子型が持ち込まれ、集団発生となっている可能性を示唆するものと考えられた。食中毒事例において、無症状の調理従事者に約 12%の感染者があり、二次汚染の原因となり得る可能性が示唆された。流入下水のモニタリングにより、集団発生や大きな流行を予測することがある程度可能と考えられた。

A. 研究目的

食中毒等の集団発生の予防および食品の安全を確保するために、地域におけるノロウイルス等の胃腸炎ウイルスの流行状況を把握し、感染性胃腸炎集団発生事例および同時期の下水処理場の流入水から得られたノロウイルスの遺伝子型を解析し、ノロウイルス感染症の流行の全体像の把握を試みた。

B. 研究方法

1. 材料

2013/14～2016/17 シーズンにおける岩手県内のノロウイルスの集団発生事例の疫学情報および患者便を対象とした。

2014/15～2016/17 シーズンにおける県内 A 下水処理場の流入水を調査対象とした。

2. 疫学情報の解析

2013/14～2016/17 シーズンにおける県内のノロウイルスの集団発生事例の疫学情報の解析を行った。

3. 患者便からのノロウイルス遺伝子の検出および遺伝子型別

10%糞便乳剤 140μl から QIAamp Viral RNA Mini Kit(QIAGEN)を用いて RNA 抽出を行った後、PrimeScript RT Master Mix (Perfect Real Time) (TaKaRa) で逆転写を行い c DNA を合成した。ノロウイルスの検出は、厚生

労働省通知法(平成 19 年 5 月 14 日付け食安監発題 0514004 号)に準じて行った。ノロウイルスが検出された検体について、増幅プライマー（GI は COG1F または G1SKR、GII は COG2F または G2SKR）を使用し、得られた PCR 産物のダイレクトシークエンス法により塩基配列を決定後、Norovirus genotyping tool (http://www.rivm.nl/mpf/typingtool/norovirus/#/)を用いて遺伝子型を同定した。

4. 流入下水からのノロウイルス遺伝子の検出および遺伝子型別

2014 年 9 月～2017 年 11 月の各月に県内 A 下水処理場で採取された下水流入水について、ノロウイルスの検出を行った。流入下水 400ｍｌを 12,000rpm、20 分冷却遠心し、その上清に 2.5M $MgCl_2$ を添加（最終濃度 0.05M）後、0.5N HCl でｐH3.5 に調整したものを蛋白低吸着フィルター（0.47μｍ）でろ過した。フィルターを細断し、3%beef extract を添加後、振とうし、5 分間静置した後、8,000rpm、1 分遠心した。溶出液を回収し、QIAamp Viral RNA Mini Kit(QIAGEN)を用いて RNA 抽出を行った後、PrimeScript RT Master Mix（Perfect Real Time）（TaKaRa）で逆転写反応を行いｃDNA を合成した。ノロウイルスの検出および遺伝子型別は、便検体と同様の方法で実施した。

（倫理面への配慮）

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

C. 研究結果

1. 岩手県内のノロウイルス集団発生状況（図１および図３）

過去 4 シーズンの県内保健所からの検査依頼件数の約 80～90%がノロウイルスによる集団発生で、そのうち約 6～10%が食中毒による集団発生事例であった。

2017／18 シーズンは、ノロウイルスによる集団発生が少ない一方、サポウイルスによる集団発生が複数発生している。2014／15、2015／16 シーズンには、GⅡ.4 と GⅡ.17 の流行があり、2016／17 シーズンは GⅡ.2 による大流行が保育園でみられた。保育園では毎年様々な遺伝子型が検出されており、また、複数の遺伝子型、複数のウイルスが検出される集団発生も保育園でみられた。

2. 岩手県内の食中毒事例（GⅡ.17 および GⅡ.2）（表１および表２）

2014／15 シーズン以降検出されている GⅡ.17 の食中毒事例は、調査期間中 5 件あり、原因とされた食事のメニューに生カキが含まれていた事例も複数あったが、調理従事者便からノロウイルスが検出されている事例が多くみられ、感染した調理従事者を介した食品の汚染が疑われた。

一方、GⅡ.17 に対して、GⅡ.2 の食中毒事例は少なく 1 件であったが、この症例でも、従事者の複数名にノロウイルス感染者が確認された。

3. 有症者・無症状者からのノロウイルス検出状況（図４）

過去 4 シーズンのノロウイルスの集団発生事例における有症者と無症状者のノロウイルスの検出状況は、無症状の調理従事者の約 12%からノロウイルスが検出された。

4. 流入下水中のノロウイルス検査と遺伝子型（図 2）

2014 年 9 月から 2017 年 11 月の調査期間中、ノロウイルスは、GⅠ、GⅡともにほぼ毎月検出された。検出された遺伝子型は、2014／15 シーズン、2015／16 シーズンと集団発生の多かった GⅡ.17、2016／17 シーズンに多発した GⅡ.2 については、集団発生が起こる約 3 か月前から流入下水からの検出が確認された。

一方、下水から検出された遺伝子型のうち、GⅠ.1、GⅠ.5、GⅠ.6, GⅠ.7、GⅠ.9、GⅡ.21 は集団発生では検出されなかった。

D. 考察

2014／15 シーズンに GⅡ.17 が検出されはじめ、2015／16 シーズンの GⅡ.4 と GⅡ.17 の流行や、2016／17 シーズンは GⅡ.2 の低年齢層での大流行は他県と同様の傾向であった。GⅡ.4 はシーズンによって流行の大きさは異なるが、恒常的に流行が見られた。

保育園で検出される遺伝子型等の多様性は、免疫の低い低年齢層の集団に、周囲に存在する様々な遺伝子型が感染し、集団発生となっている可能性を示唆するものと考えられた。

食中毒事例において、無症状の調理従事者に約 12%の感染者があり、二次汚染の原因となり得る可能性が示唆された。

流入下水のモニタリングにより、集団発生や大きな流行を予測することがある程度可能と考えられた。流入下水から検出された遺伝子型でも、集団発生で検出されない遺伝子型は、感染しても病原性が低い、あるいは無症状であることが推察された。

E. 結論

保育園での集団発生にみられる、遺伝子型等の多様性から、子供たちが、どこから感染を受けているのか調査する必要性を感じた。また、食中毒事例における調理従事者内の不顕性感染者は、感染を拡大する要因となるため、保育園等の集団生活を行う施設や、飲食店等への指導の際には不顕性感染者の存在を認識させることが重要である。

F. 研究発表

1. 論文発表
   なし
2. 学会発表
   なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

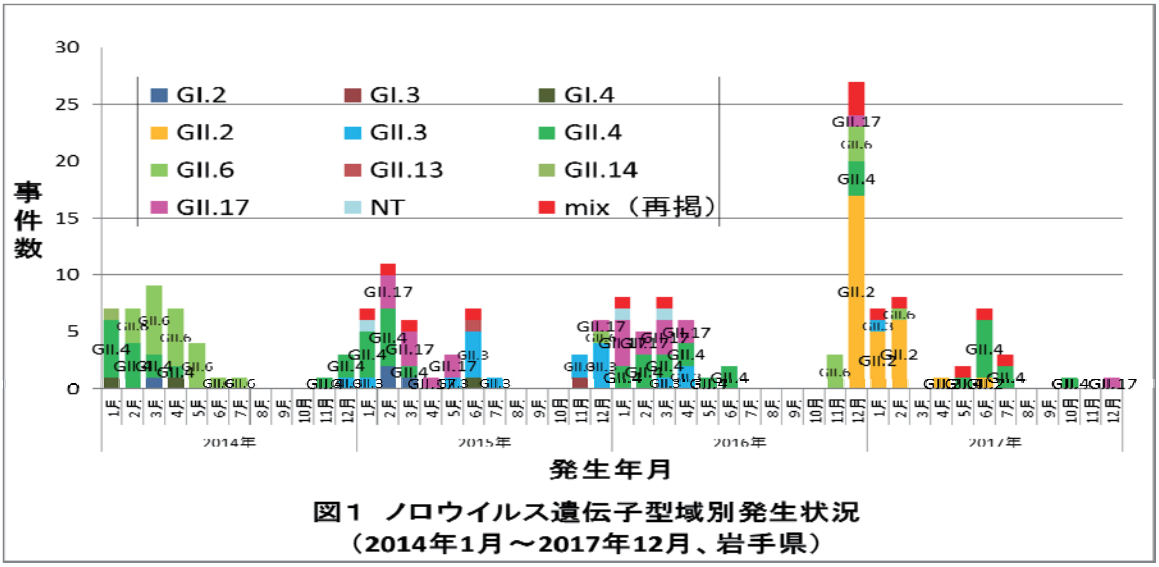


図1　ノロウイルス遺伝子型域別発生状況
（2014年1月～2017年12月、岩手県）

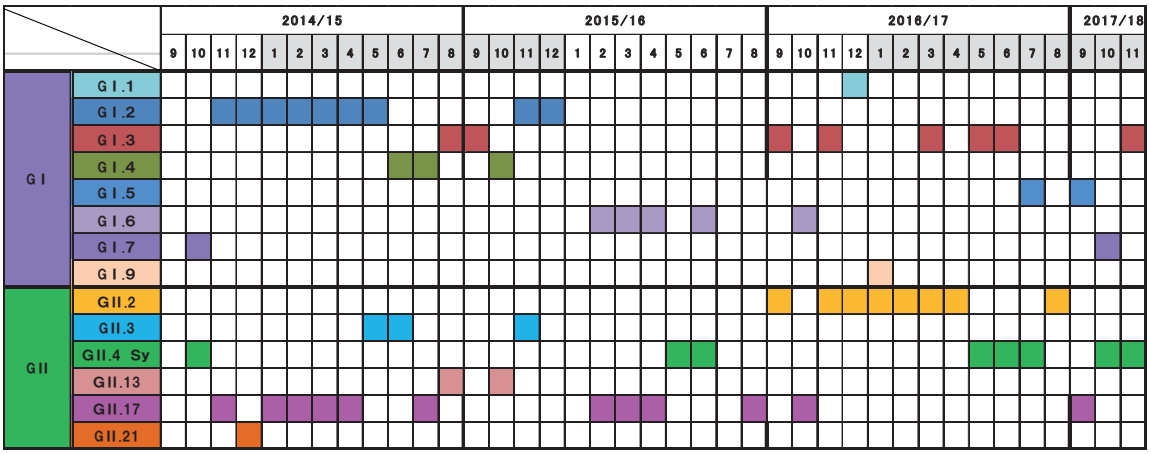


図2　流入下水中のノロウイルスの遺伝子型
（2014 年 9 月～2017 年 11 月、岩手県 A 下水処理場）

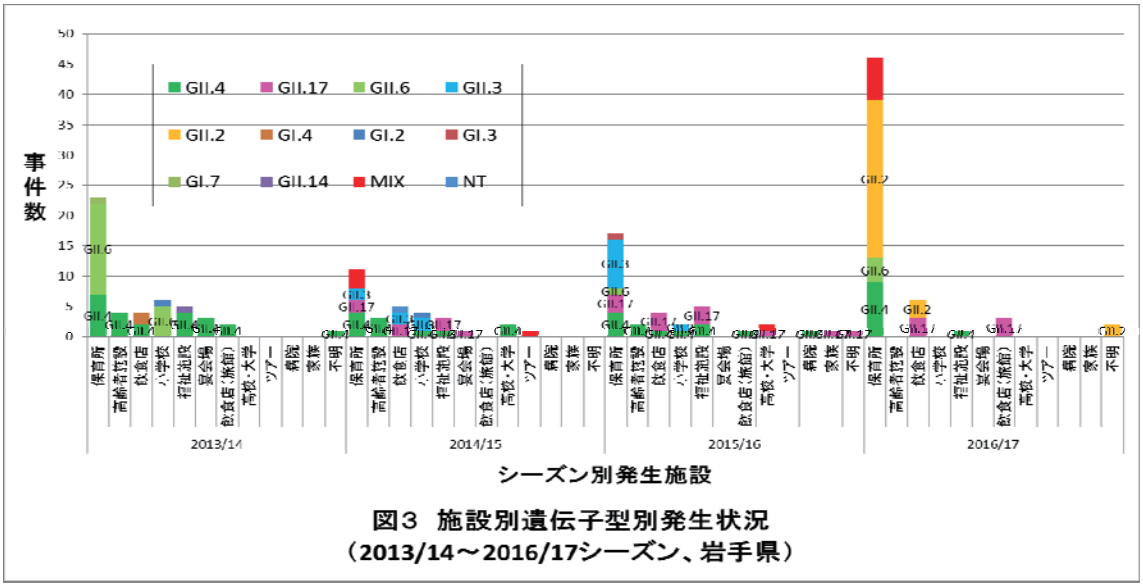


図3　施設別遺伝子型別発生状況
（2013/14～2016/17シーズン、岩手県）

表１　ノロウイルス GII.17 による食中毒事例
（2014/15～2016/17 シーズン、岩手県）

発生年月	原因食品	原因施設	検査結果
2015.2月	施設が提供した食事	給食施設（老人ホーム）	調理従事者 6名中2名陽性
2015.2月	飲食店が提供した食事	飲食店	調理従事者 2名中2名陽性
2016.1月	飲食店が提供した料理（生カキ含む）	飲食店	従業員 8名中1名陽性
2016.3月	飲食店が提供した食事	飲食店	調理従事者 7名中2名陽性
2016.12月	飲食店が提供した食事（生カキ含む）	飲食店	調理従事者 10名中陽性者なし

表２　ノロウイルス GⅡ.2 による食中毒事例（2017 年、岩手県）

発生年月	原因食品	原因施設	検査結果
2017.1月	飲食店が提供した食事	飲食店	調理従事者 5名中3名陽性

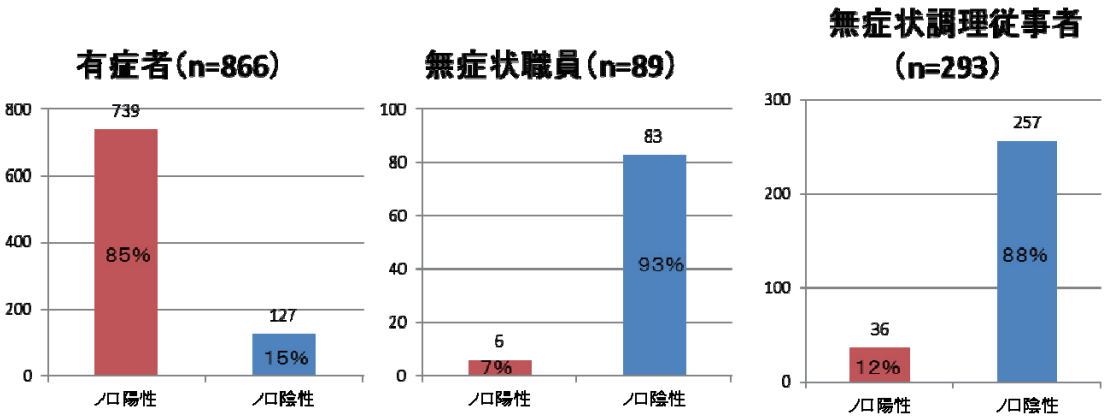


図４　有症者・無症状者（施設職員、調理従事者）からの検出状況
（2013 年９月～2017 年 12 月、岩手県）

平成 29 年度厚生労働科学研究費補助金・食品の安全確保推進研究事業
「ウイルスを原因とする食品媒介性疾患の制御に関する研究」
研究協力報告

秋田県内で市販されている二枚貝からのノロウイルスの検出および 2016/2017 シーズンのノロウイルスの検出状況

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

研究要旨

秋田県内で流通している二枚貝について、ノロウイルス（NoV）の検出を行った。年間を通して市販されている生アサリからは、2016 年 11 月～2017 年 1 月および 2017 年 4 月購入分から GII.2 が検出され、定量値（単位：コピー数/g 中腸腺）はいずれも 10^2 以上 10^3 未満であった。2017 年 10 月には GII.4 Sydney 2012 が検出されたが、定量値は得られなかった。2016 年 12 月、2017 年 1 月、4 月には GI.7 が検出され、定量値は 10^1 以上 10^2 未満であった。砂抜き液は不検出であった。パック入り生カキからは、2016 年 12 月～2017 年 3 月に GII が検出され、遺伝子型は GII.2、GII.3、GII.17 が確認された。定量値はいずれも 10^2 以上 10^4 未満であった。GI は 2017 年 1 月、2 月、4 月に検出され、遺伝子型は GI.2、GI.4 であった。いずれも低い定量値であった。パック充填の浮遊液は、2017 年 3 月の 1 検体から GII.17 が検出され、定量値（単位：コピー数/mL）は 9.39 であった。2017 年 5 月に購入した県外産岩ガキからは、GII.4 Sydney 2012 が検出されたが、定量値は得られなかった。2017 年 6 月に購入した県内産岩ガキからは GII.17 が検出された。定量値は低く 6.28×10 であった。

2016/2017 シーズンの秋田県における食中毒事例は、カキが推定原因食品であった 1 事例のみで NoV GII.2 が検出された。集団感染事例および感染症発生動向調査において検出された NoV の遺伝子型は、GII.2 が最も多く、検出のピークは 12 月であった。次いで検出が多かった GII.4 Sydney 2012 は 4 月以降に増加が認められた。

今回の結果から、秋田県で流通している二枚貝の NoV 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と相関す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。これまで冬季における二枚貝のウイルス汚染について検査を実施してきたが、今回は年間を通して秋田県内で市販されている二枚貝のノロウイルス（NoV）について検査を行い、その汚染状況を確認した。

また、秋田県において 2016/2017 シーズンに感染性胃腸炎患者から検出された NoV の状況についても併せて報告する。

B. 研究方法

1. 材料および対象

1） 市販殻付き生アサリ

秋田市内で販売している国産(2 都道府県 2 海域）の殻付き生アサリを用いた。同一産地のアサリを同一店舗から継続して購入し、ウイルス検出状況の推移を観察した。1 海域は年間を通して販売されており 2016 年 10 月～2017 年 11 月まで、他方の 1 海域は販売されていた 2017 年 4 月～7 月の検査を行った。両海域ともに、1 パックに入っているアサリの中腸腺をすべて合わせて 1 検体とした。また、2017 年 2 月以降のアサリについては、砂抜き（3%の食塩水で 6 時間程度）をした液の検査も実施した。

2） 市販殻付き生ハマグリ

秋田市内で 2017 年 3 月と 10 月に販売していた中国産の殻付き生ハマグリについて検査を行った。アサリ同様、1 パックに入っているハマグリの中腸腺をすべて合わせて 1 検体とした。3 月のハマグリについては、砂抜きをした液の検査も実施した。

3） パック入り市販生カキ

2016 年 10 月～2017 年 4 月に秋田市内で購入した国産の生カキを用いた。2016 年 10 月～2017 年 3 月までは生食用 2 都道府県 6 海域（ロット）を用意し、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：28 検体）の検査を行った。4 月の生カキは中腸腺 1 個を 1 検体とし、5 検体の検査を行った。また、2017 年 1 月以降は、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検査を行った。

4） 市販岩ガキ

① 県外産殻付き岩ガキ

2017 年 5 月に秋田市内で購入した県外産 1 県 1 海域の岩ガキついて、中腸腺 1 個を 1 検体とし、2 検体の検査を行った。

②秋田県産殻付き岩ガキ

2017 年 6 月に秋田市内で購入した秋田県産 2 海域の岩ガキについて、中腸腺 1 個を 1 検体とし、1 海域につき 5 検体（合計：10 検体）の検査を行った。

5） 食中毒事例および集団感染事例

2016/2017 シーズンに NoV が検出された食中毒事例 1 事例と集団感染事例 33 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）。

6） 感染症発生動向調査

病原体定点医療機関において 2016/2017 シーズンに小児科から採取された糞便検体 253 検体のうち NoV が検出された 45 検体を集計対象とした。

2. 方法

1） 二枚貝からのウイルス検出

厚生労働省通知法（平成 19 年 5 月 14 日付け食安監発第 0514004 号)「貝の中腸腺を用いた方法（超遠心法)」に準じ濃縮を行い、QIAamp Viral RNA Mini Kit

（QIAGEN）により核酸を抽出した。抽出時にはニッポンジーンの「DNaseI（RT Grade)」を用い、オンカラムDNaseI処理を実施した。その後、Kojimaらの方法（J. Virol. Methods, 100, 107-114, 2002.）によりNoVの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、ダイレクトシークエンスにて塩基配列を決定した。

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、Kageyama らの方法（J. Clin. Microbiol., 41, 1548-1557, 2003.）により NoV のリアルタイム 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、ダイレクトシークエ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. 二枚貝からのNoV検出状況

1）市販殻付き生アサリ（表1、表2）

年間を通して市販されていた産地Kの生アサリからは、2016年11月～2017年1月および4月にGII.2が検出され、定量値（単位：コピー数/g中腸腺）はいずれも10^2以上10^3未満であった。2017年10月にはGII.4 Sydney 2012が検出されたが、極微量のため定量値は得られなかった。2016年12月、2017年1月、4月にはGI.7が検出され、定量値は10^1以上10^2未満であった。砂抜き液は、生アサリからNoVが検出された2検体を含む5検体について検査を実施したが、いずれも不検出であった。2017年4月～7月に購入した産地Hの殻付き生アサリについては、すべての検体において不検出であった。

2）市販殻付き生ハマグリ（表3）

2017年3月と10月に購入した中国産生ハマグリにおいては、いずれも不検出であった。3月には砂抜き液についても検査を行ったが不検出であった。

3）パック入り市販生カキ（表4、表5）

検出されたGIIの遺伝子型は、海域Bの生カキから2016年12月～2017年3月までGII.2のみが検出され、定量値はいずれも10^2以上10^3未満であった。海域Aの生カキからは、2016年12月にGII.3が検出され、2017年1月、3月にはGII.17、2月にはGII.2、GII.17が検出された。定量値は10^2以上10^4未満であった。GIの遺伝子型は、2017年1月に海域A、BからGI.2が検出され、2017年2月には海域AからGI.4が検出された。また、中腸腺1個を1検体として検査を実施した海域Bにおける4月の生カキ1検体からは、GI.2が検出された。定量値は1.97～8.41×10で、いずれも低い定量値であった。浮遊液は、3月に購入した海域AからGII.17が検出され、定量値（単位：コピー数/mL）は9.39であった。

4）岩ガキ

① 県外産殻付き岩ガキ（表6）

2017年5月に購入した県外産（I産）岩ガキからはGII.4 Sydney 2012が検出されたが、定量値は得られなかった。

② 秋田県産殻付き岩ガキ（表7）

2017年6月に購入した秋田県産殻付き

岩ガキからはGII.17が検出された。定量値は低く6.28×10であった。

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8に示す。2016/2017シーズンはNoVが検出された1事例のみの発生で、カキが原因食品と推定された事例であった。検出遺伝子型はGII.2であった。

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9に示す。2016年10月以降、GII.2の検出が増加し、25例（71.4%）と最も多かった。次いで、GII.4 Sydney 2012が7例（20.0%）で2017年4月以降に増加が見られた。GII.6、GII.17とGI.4はそれぞれ1例（2.9%）から検出された。GII.6が検出された1例およびGI.4が検出された1例からはGII.2も同時に検出された。

4. 感染症発生動向調査における NoV の遺伝子型別検出状況

感染症発生動向調査において検出されたNoVの遺伝子型について表10に示す。GII.2が26例（56.5%）と最も多く、その検出は2016年11月以降に増加しており、集団感染事例の検出状況と同様に12月がピークとなった。17例（37.0%）の検出があったGII.4 Sydney 2012は2017年4月以降に多く確認された。GII.3、GI.2およびGI.7はそれぞれ1例（2.2%）が検出された。GI.7が検出された1例からはGII.4 Sydney 2012も同時に検出された。

D. 考察

秋田市内で2016年10月～2017年5月に購入した生カキから検出されたGII.2とGII.4の遺伝子型は、本県における感染症発生動向調査および食中毒・集団感染事例からも同じ時期に確認されていた。これらのカキは県外産であり、カキの海域周辺でも本県同様の流行があったものと考えられた。一方、全国的に検出数が減少しているGII.17（IASR_HP：月別ノロウイルスGII 遺伝子型検出報告状況）は、2017年1月～3月のパック入り生カキおよび2017年6月に購入した本県産の岩ガキから検出されている。これらの結果から、GII.17はカキとの関連性が強く、不顕性感染等により環境中で維持され続けている可能性が考えられた。定量値においては、胃腸炎に関連したカキのNoV汚染量が10^3コピー数/g程度であったとする報告がある（食品衛生学雑誌 2017 Vol.58 No.1）。2016年12月～2017年3月に検出されたGIIの定量値はすべて10^2以上であったこと、また、カキ1個当たりの中腸腺が1～3g程度であることから、それらの供試生カキは1～数個の喫食で感染が成立するものと考えられた。秋田県産の岩ガキから検出されたNoVの定量値は低く、自主検査では陰性と判断されるコピー数であり感染性は低いと考えられる。しかしながら、NoVの保有は感染の可能性を示唆する結果でもあり、今後も注意が必要であると思われた。浮遊液は、今回も昨年と同一の海域からNoVが検出された。この結果は調理時汚染の可能性を示唆しており、引き続き啓発等に役立て行きたいと考えている。

一年を通して検査を実施した殻付き生アサリから検出された NoV の遺伝子型も生カキ同様に本県の流行状況とほぼ一致していた。アサリにおいても産地周辺で同様の流行があったものと考える。今回検査に使用したアサリの中腸腺は 1 個当たり 0.1～0.2g 程度であり、得られた定量値から単純に換算すると、アサリ 1 個の喫食では感染の可能性は低いと考えられる。しかし、料理によってはアサリ数十個が使用され、また、殻の開口を目安に調理を終了した場合には、加熱不十分な状態で食卓に提供されることも危惧される。生カキを契機とする NoV の感染は、近年の報道等によりその危険性が周知されつつある中、カキ以外の二枚貝における感染の可能性については認識が不足しているように思われる。今回の結果は注意喚起を促すデータとして重要であると考えられた。

E. 結論

市販生カキおよび生アサリから検出された NoV の遺伝子型は、市中の流行と相関するものと考えられた。今回、秋田県産の岩ガキにおいて NoV が検出されたことから、今後は秋田県内の下水についても検査を実施し、岩ガキへの影響等を詳細に調査して行きたいと考えている。

F. 研究発表

1. 論文発表

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

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

2. 学会発表

1) 斎藤博之、秋野和華子、佐藤寛子、清水優子、早川智、牛島廣治、野田衛:生カキが原因でノロウイルスに感染した症例におけるノロウイルス排泄状況と抗体価の推移、第 29 回秋田応用生命科学研究会講演会、2017、秋田

2) 斎藤博之、秋野和華子、佐藤寛子、清水優子、早川智、牛島廣治、野田衛:パンソルビン・トラップ法の捕捉抗体供給源としてのガンマグロブリンの再評価、第 38 回日本食品微生物学会学術総会、2017、徳島

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

4) Hiroyuki Saito, Yuko Shimizu, Hiroko Sato, Wakako Akino, Satoshi Hayakawa and Hiroshi Usijima : Immunological response in a patient of noroviruses infection associated with raw oyster. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会、2017、大阪

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、野田衛:ノロウイルス GII.17 に対するパンソルビン・トラップ法の有効性に関する検討、第 113 回日本

食品衛生学会学術講演会、2017、東京

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　市販殻付き生アサリからの NoV 検出状況（産地 K）

シーズン	購入月	加工日	個数	ノロウイルス				砂抜き液
				GⅡ		GⅠ		
				遺伝子型	コピー数/g中腸腺	遺伝子型	コピー数/g中腸腺	
2016/17	10月	2016年10月16日	26	(－)	NT	(－)	NT	NT
	11月	2016年11月25日	29	GII.2	627.45	(－)	NT	NT
	12月	2016年12月17日	24	GII.2	464.31	GI.7	38.90	NT
	1月	2017年1月19日	20	GII.2	981.96	GI.7	26.10	NT
	2月	2017年2月13日	28	(－)	NT	(－)	NT	(－)
		2017年2月13日	29	(－)	NT	(－)	NT	(－)
	3月	2017年3月13日	31	(－)	NT	(－)	NT	(－)
	4月	2017年4月18日	21	GII.2	445.49	GI.7	32.94	(－)
	5月	2017年5月15日	25	(－)	NT	(－)	NT	NT
	6月	2017年6月14日	21	(－)	NT	(－)	NT	NT
	7月	2017年7月18日	25	(－)	NT	(－)	NT	NT
	8月	2017年8月21日	29	(－)	NT	(－)	NT	NT
2017/18	9月	2017年9月13日	24	(－)	NT	(－)	NT	NT
	10月	2017年10月18日	34	GII.4*	0.00	(－)	NT	(－)
	11月	2017年11月20日	27	(－)	NT	(－)	NT	NT

(－)：不検出　　＊　GII.4 ： GII.4 Sydney 2012

表２　市販殻付き生アサリからの NoV 検出状況（産地 H）

シーズン	購入月	加工日	個数	ノロウイルス				砂抜き液
				GⅡ		GⅠ		
				遺伝子型	コピー数/g中腸腺	遺伝子型	コピー数/g中腸腺	
2016/17	4月	2017年4月16日	13	(－)	NT	(－)	NT	NT
	5月	2017年5月15日	9	(－)	NT	(－)	NT	NT
	6月	2017年6月14日	11	(－)	NT	(－)	NT	NT
	7月	2017年7月17日	9	(－)	NT	(－)	NT	NT

表３　市販殻付き生ハマグリからの NoV 検出状況（中国産）

シーズン	購入月	加工日	個数	ノロウイルス				砂抜き液
				GⅡ		GⅠ		
				遺伝子型	コピー数/g中腸腺	遺伝子型	コピー数/g中腸腺	
2016/17	3月	2017年3月13日	9	(－)	NT	(－)	NT	(－)
2017/18	10月	2017年10月18日	6	(－)	NT	(－)	NT	NT

表４　パック入り市販生カキからのNoV検出状況（2016年10月～2017年3月）

シーズン	購入月	検体名 海域	加工日	個数	ノロウイルス				浮遊液 コピー数/mL
					GⅡ		GⅠ		
					遺伝子型	コピー数/g中腸腺	遺伝子型	コピー数/g中腸腺	
2016/17	10月	生カキ B-9	2016年10月14日	3	(－)	NT	(－)	(－)	NT
				3	(－)	NT	(－)	(－)	
	11月	生カキ B-9	2016年11月24日	3	(－)	NT	(－)	(－)	NT
				3	(－)	NT	(－)	(－)	
				2	(－)	NT	(－)	(－)	
	12月	生カキ B-9	2016年12月16日	3	(－)	NT	(－)	(－)	NT
				3	(－)	NT	(－)	(－)	
				2	GII.2	426.67	(－)	(－)	
		生カキ A-30	2016年12月16日	4	GII.3	445.49	(－)	(－)	NT
				4	GII.3	173.49	(－)	(－)	
				3	(－)	NT	(－)	(－)	
	1月	生カキ B-9	2017年1月26日	3	(－)	NT	(－)	(－)	(－)
				3	GII.2	110.27	(－)	(－)	
		生カキ B-9	未記入 消費期限：2017年1月31日	3	GII.2	683.92	GI.2	0.00	(－)
				2	GII.2	887.84	(－)	(－)	
		生カキ A-30	2017年1月27日	3	GII.17	1446.27	(－)	(－)	(－)
				3	GII.17	1245.59	GI.2	12.64	
				3	GII.17	1712.94	(－)	(－)	
	2月	生カキ B-9	未記入 消費期限：2017年3月2日	4	GII.2	135.22	(－)	(－)	(－)
				3	GII.2	392.16	(－)	(－)	
		生カキ A-30	2017年2月24日	3	GII.17	1041.57	GI.4	1.97	(－)
				3	GII.2	674.51	GI.4	2.32	
				2	GII.17	743.53	(－)	(－)	
	3月	生カキ B-6	未記入 消費期限：2017年3月20日	4	GII.2	150.90	(－)	(－)	(－)
				4	GII.2	283.29	(－)	(－)	
		生カキ A-21	2017年3月17日	3	GII.17	577.25	(－)	(－)	GII.17 9.39
				2	(－)	NT	(－)	(－)	
				2	(－)	NT	(－)	(－)	

表５　パック入り市販生カキからのNoV検出状況（2017年4月）

シーズン	購入月	検体名 海域	加工日	個数	ノロウイルス				浮遊液
					GⅡ		GⅠ		
					遺伝子型	コピー数/g中腸腺	遺伝子型	コピー数/g中腸腺	
2016/17	4月	生カキ B-9	未記入 消費期限：2017年4月18日	1	(－)	NT	(－)	(－)	(－)
				1	(－)	NT	(－)	(－)	
				1	(－)	NT	GI.2	84.08	
				1	(－)	NT	(－)	(－)	
				1	(－)	NT	(－)	(－)	

表 6　県外産市販殻付き岩ガキからの NoV 検出状況（2017 年 5 月）

シーズン	購入月	産地 検体名	加工日	個数	ノロウイルス			
					GⅡ		GⅠ	
					遺伝子型	コピー数/g中腸腺	遺伝子型	コピー数/g中腸腺
2016/17	5月	I産 岩ガキ	2017年5月14日	1	GII.4*	0.00	(－)	NT
				1	(－)	NT	(－)	NT

＊　GII.4 ： GII.4 Sydney 2012

表 7　秋田県産市販殻付き岩ガキからの NoV 検出状況（2017 年 6 月）

シーズン	購入月	海域 検体名	加工日	個数	ノロウイルス			
					GⅡ		GⅠ	
					遺伝子型	コピー数/g中腸腺	遺伝子型	コピー数/g中腸腺
2016/17	6月	秋田県0産 岩ガキ	2017年6月8日	1	(－)	NT	(－)	NT
				1	(－)	NT	(－)	NT
				1	(－)	NT	(－)	NT
			2017年6月10日	1	(－)	NT	(－)	NT
				1	(－)	NT	(－)	NT
		秋田県T産 岩ガキ	2017年6月9日	1	GII.17	62.75	(－)	NT
				1	(－)	NT	(－)	NT
				1	(－)	NT	(－)	NT
			2017年6月10日	1	(－)	NT	(－)	NT
				1	(－)	NT	(－)	NT

表 8　秋田県における食中毒事例の詳細（2016/2017 シーズン）

依頼年月日	推定原因食品	原因施設	検出ノロウイルス遺伝子型	備　考
2017年1月15日	カキ酢（推定）	旅館	GII.2	照会事例：宮城県

表 9　集団感染事例において検出された NoV の遺伝子型（2016/2017 シーズン）

	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	計
GII.2		1	6*1	12		4	1*2				1		25
GII.4 Sydney 2012								3	2	1	1		7
GII.6			1*1										1
GII.17										1			1
GI.4							1*2						1
計	0	1	7	12	0	4	2	3	2	2	2	0	35

（株数）

＊1：11 月の 6 事例中 1 事例より GII.2 と GII.6 の 2 種類の遺伝子型を検出

＊2：3 月の 1 事例より GII.2 と GI.4 の 2 種類の遺伝子型を検出

表 10　感染症発生動向調査において検出された NoV の遺伝子型（2016/2017 シーズン）

	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	計
GII.2			3	10	6	1	3	2	1				26
GII.3			1										1
GII.4 Sydney 2012	1			2				2	4*	6	1	1	17
GI.2	1												1
GI.7									1*				1
計	2	0	4	12	6	1	3	4	6	6	1	1	46

（株数）

＊：5 月の 5 検体中 1 検体より GII.4 Sydney 2012 と GI.7 の 2 種類の遺伝子型を検出

平成 29 年度厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)
「ウイルスを原因とする食品媒介性疾患の制御に関する研究」
研究協力報告

宮城県における感染性胃腸炎の流行状況と過去 7 シーズンとの比較

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

研究要旨

2010/11 シーズンから 2017/18 シーズンに宮城県内で検出されたノロウイルス（NoV）について，遺伝子型を比較した結果，シーズンを通じて GⅡ.4 が最も多く検出された。一方，シーズンによっては GⅡ.2，GⅡ.3，GⅡ.17 による流行も確認された。また，2016 年 7 月から 2017 年 12 月に採取された流入下水 78 検体を対象に NoV およびサポウイルス（SaV）遺伝子を定量的に検出した結果，NoV，SaV ともに遺伝子は通年検出され，特に SaV は年間を通して昨シーズンよりも高い濃度で検出された。

A.　研究目的

2010/11 シーズンから 2017/18 シーズンに宮城県内で検出されたノロウイルス(NoV)の遺伝子型の特徴を把握するとともに今シーズンの感染性胃腸炎の流行状況について昨シーズンと比較した。

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

B.　研究方法

1.　材料

1）感染性胃腸炎患者の報告数および検体

2016/17 シーズンと 2017/18 シーズンの感染性胃腸炎の流行状況の把握は宮城県結核・感染症発生動向調査（以下，発生動向調査）の感染性胃腸炎患者報告数を用いた。一方，遺伝子型の比較は，2010/11 シーズンから 2017/18 シーズンの期間に県内で発生した感染性胃腸炎集団発生事例 283 事例から検出された NoV 遺伝子を分子疫学的に解析した。

2）下水試料

県内の都市部に所在する下水処理場の流入下水を 2016 年 7 月から 2017 年 12 月の毎週 1 回採水し，計 78 検体を試料とした。

2.　検体処理

1）感染性胃腸炎の糞便検体

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

2）下水試料

流入下水を混和後 25mL 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℃で1晩撹拌した後，9,100×gで20分間冷却遠心した。上清をアスピレーターで吸引除去し，沈渣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。

3. ウイルス遺伝子の抽出と各ウイルス遺伝子の検出

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

逆転写反応および各ウイルス遺伝子の検出は図 1 に示した方法で行った。

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

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

(倫理面への配慮)

本研究では，特定の研究対象者は存在せず，倫理面への配慮は不要である。

C. 研究結果

1. 県内における感染性胃腸炎の流行状況

国立感染症研究所の病原微生物検出情報によると，2016/17 シーズンは全国的にNoV GⅡ.2による感染性胃腸炎が大流行した。県内での感染性胃腸炎の患者報告数は，2016年第48週に定点医療機関当たり 45.7 人となり，過去 10 年間で最多であった。一方，2017年は第20週，第25週，第50週に小さなピークが見られるものの患者報告数は9.3人，9.9人，8.6人となっており，2016 年と比較すると流行期の患者報告数が著しく少なかった（図2)。また，2017年1月から12月に県内で発生した感染性胃腸炎の集団発生は18事例で，昨年同時期には 116 事例の発生があったことからも，2017年の流行が2016年よりも少なかったことが示された。2017 年の 18 事例について検出されたウイルス別に見てみると NoV が 13 事例，SaVとアストロウイルスが各2事例，ロタウイルスが1事例であった（図3)。

NoV が関与した 13 事例から検出されたNoVの遺伝子群は全てGⅡ群であり，遺伝子型はGⅡ.2が1月の2事例で検出され，それ以降の事例では全てGⅡ.4が検出された（図4)。今シーズンに検出された遺伝子型を過去 7 シーズンと比較すると，2010/11シーズンは多種類の遺伝子型が検出されているがGⅡ.2とGⅡ.3の占める割合が大きく，2011/12 シーズンから2015/16シーズンはGⅡ.4が流行の主

体で遺伝子型が決定できた株の 36%から 66%を占めていた。また,2014/15 シーズンと 2015/16 シーズンには GⅡ.17 Kawasaki 株近縁株もそれぞれ 27%と 40%確認された。2016/17 シーズンは GⅡ.2 が検出された遺伝子型の 90%以上を占めていた。今シーズンに検出された株は全て GⅡ.4 で,全シーズンを通じて最も多く検出された（図 5)。

GⅡ.4 の亜型についてシーズン毎に比較すると，2010/11 シーズンと 2011/12 シーズンに同定できたものは全て 2006.b で，2012/13 シーズンは 2006.b に替わって Sydney_2012 が流行の主体となり,以降のシーズンに検出されたのは全て Sydney_2012 であった（図 6)。

2. 流入下水中からのウイルス遺伝子検出状況

1) NoV の検出状況（図 7)

NoV は調査期間中の全検体から検出された。GⅠ群は 0～1.4×10^6copies/L，GⅡ群は 0～5.2×10^7copies/L で,GⅠ群と比較し全体的に GⅡ群が高い濃度で検出された。発生動向調査で感染性胃腸炎の患者報告数が急増した 2016 年の第 42 週以降は流入下水中の GⅡ群遺伝子濃度が急激に上昇し，第 49 週に採取した検体から最も多く検出された。

一方，2017 年は第 20 週と第 25 週に感染性胃腸炎患者報告数の小さなピークが見られるが,その時期の流入下水中の NoV 遺伝子濃度にはほとんど変動がなかった。また,感染性胃腸炎の流行期である 11 月以降も昨シーズンほどの患者報告数や下水中の NoV 遺伝子濃度の増加は見られなかったが，第 50 週に患者報告数の小さなピークがあり,下水中の NoV 遺伝子濃度も第 49 週から増加した。

2) SaV の検出状況（図 8)

SaV 遺伝子も通年流入下水中から検出され,2017 年は 2016 年と比較して年間を通して高濃度で検出された。特に 2017 年第 19 週から第 26 週，第 46 週から第 48 週にかけて下水中の SaV 遺伝子濃度が急増し，第 24 週に採取した検体からは 2.8×10^7copies/L の SaV 遺伝子が検出され,調査期間中で最も高い値となった。この期間は感染性胃腸炎の患者報告数の推移と SaV 遺伝子濃度の推移がほぼ一致していた。

D. 考察

2017/18 シーズンは昨シーズンよりも感染性胃腸炎流行期の患者報告数や集団発生事例数が著しく少なかった。2016/17 シーズンに大流行した NoVGⅡ.2 は 2010/11 シーズンに流行して以来,ほとんど検出されておらず，この遺伝子型に免疫のない年齢層が流行の中心であった。一方,2017/18 シーズンに検出頻度が高かった GⅡ.4_Sydney_2012 は 2012/13 シーズンから毎年検出されており，GⅡ.4_Sydney_2012 に対する免疫を有する人が多いため，流行が拡大しなかったと推測された。

下水処理施設の流入下水からは NoV のＧⅠ群，ＧⅡ群ともに通年検出されているが， ＧⅡ群の濃度が高い傾向が認められ，ＧⅡ群感染者の存在割合が高いことが考えられた。

このことは調査期間中の発生動向調査での胃腸炎患者や集団発生事例から検出された NoV が全て ＧⅡ群だったことからも強く推察された。また，ＧⅠ群は流入下水中の濃度上昇が見られることがあるが，患者からの検出がないことから，不顕性感染者が多いことが示唆された。

SaV も NoV と同様に通年検出されており，2016 年と比較して 2017 年は全体的に高い濃度で検出された。特に高濃度で検出された週の前後では発生動向調査での胃腸炎患者からは SaV 遺伝子の検出割合が増え，集団発生事例も確認された。一方，2017 年第 18 週から第 29 週にかけて確認された感染性胃腸炎患者報告数の小さな二峰性のピーク時に流入下水から検出された SaV 遺伝子数は他の時期より多いものの，2016 年第 42 週から第 48 週にかけて認められた感染性胃腸炎の大流行期に流入下水から検出された NoVGⅡ群遺伝子数とほぼ同じオーダーであることを考えると，SaV による感染性胃腸炎は NoVGⅡ群と比較すると不顕性感染が多いことが示唆された。

E. 結論

2010/11 シーズンから 2017/2018 シーズンに県内で検出された NoV の遺伝子型について比較した。その結果，ＧⅡ.4 がシーズンを通じて最も多く検出された。一方，シーズンによってはＧⅡ.2，ＧⅡ.3，ＧⅡ.17 による流行も確認できた。

また，2016 年 7 月から 2017 年 12 月にかけて流入下水中を対象に NoV および SaV 遺伝子を定量的に検出した結果，流入下水中の NoV は通年検出され，特に NoVGⅡ群濃度は感染性胃腸炎の流行を反映していた。加えて，SaV も NoV と同様に通年検出され，2017 年は NoV よりも高濃度で検出された。本調査より流入下水中の NoV をモニタリングすることで感染性胃腸炎流行の早期察知は可能と考えられた。一方，SaV は不顕性感染も多いことから流入下水による流行の早期察知の指標に関してはさらなる検討が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表：なし
2. 学会発表：なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

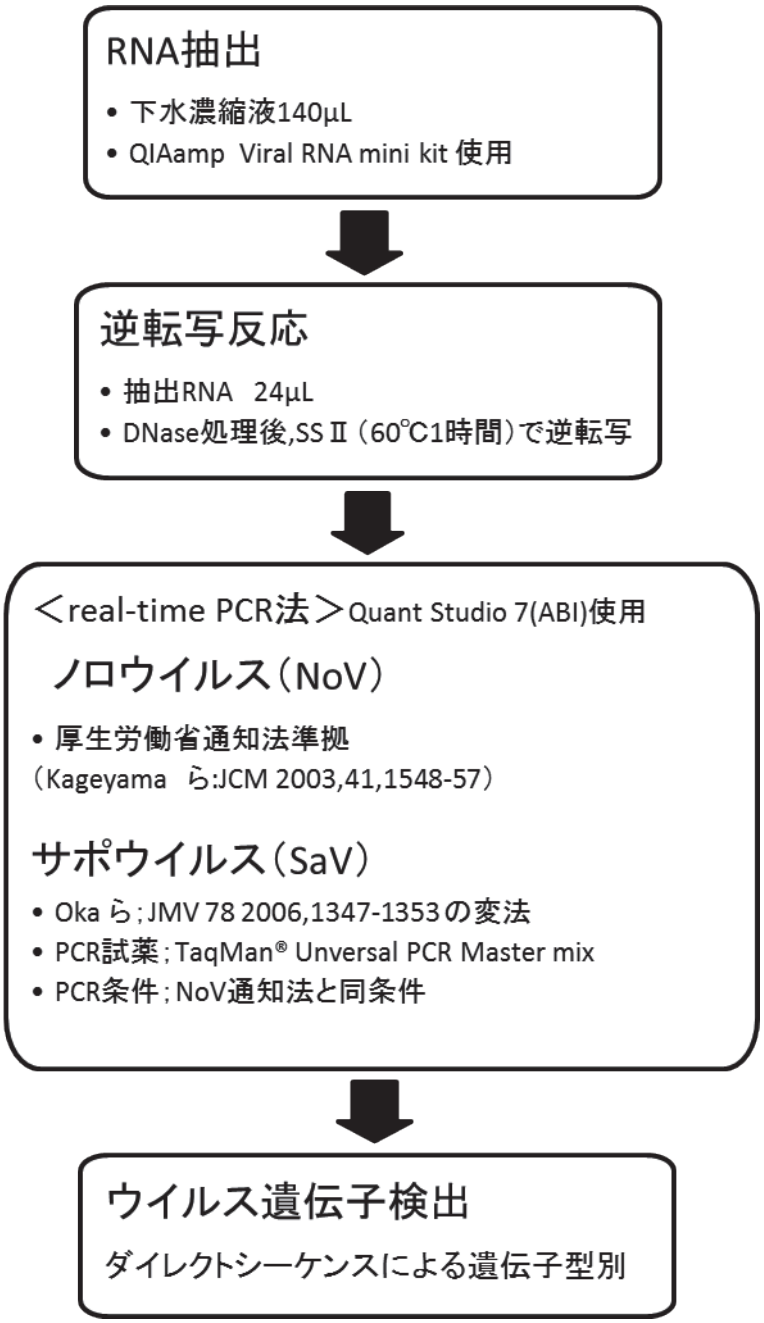


図１　ウイルス遺伝子の検出方法

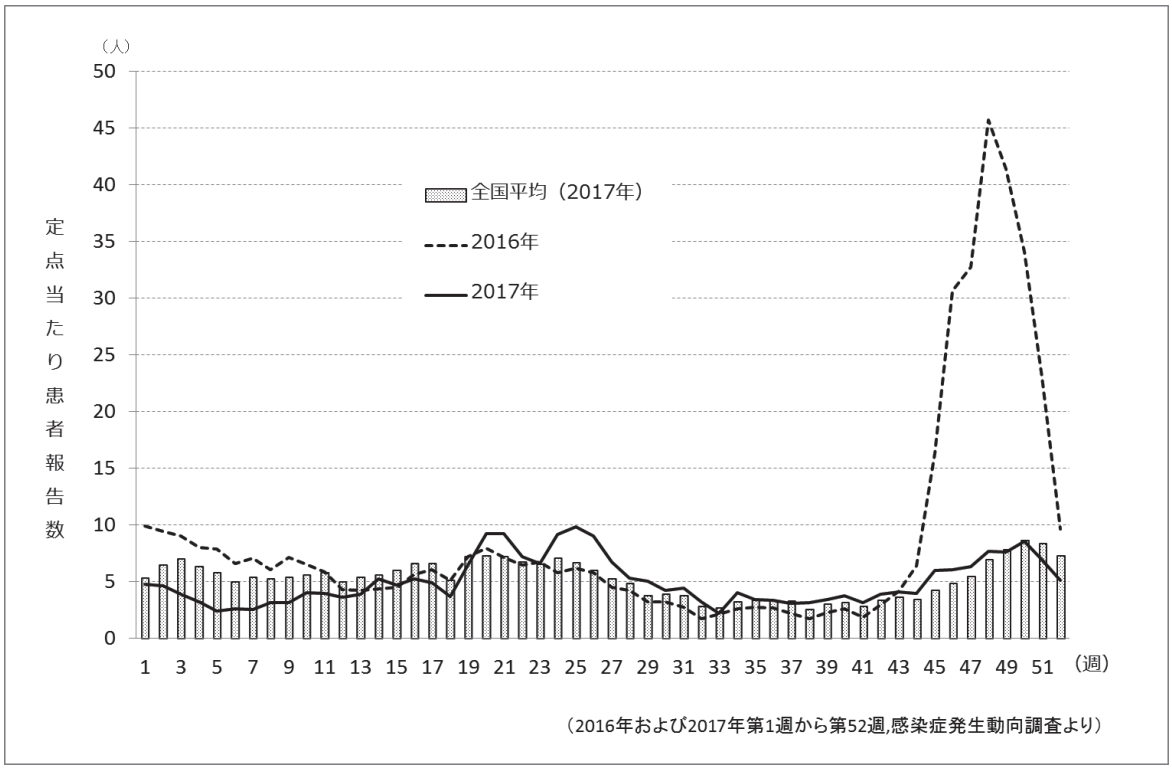


図２　感染性胃腸炎の発生動向

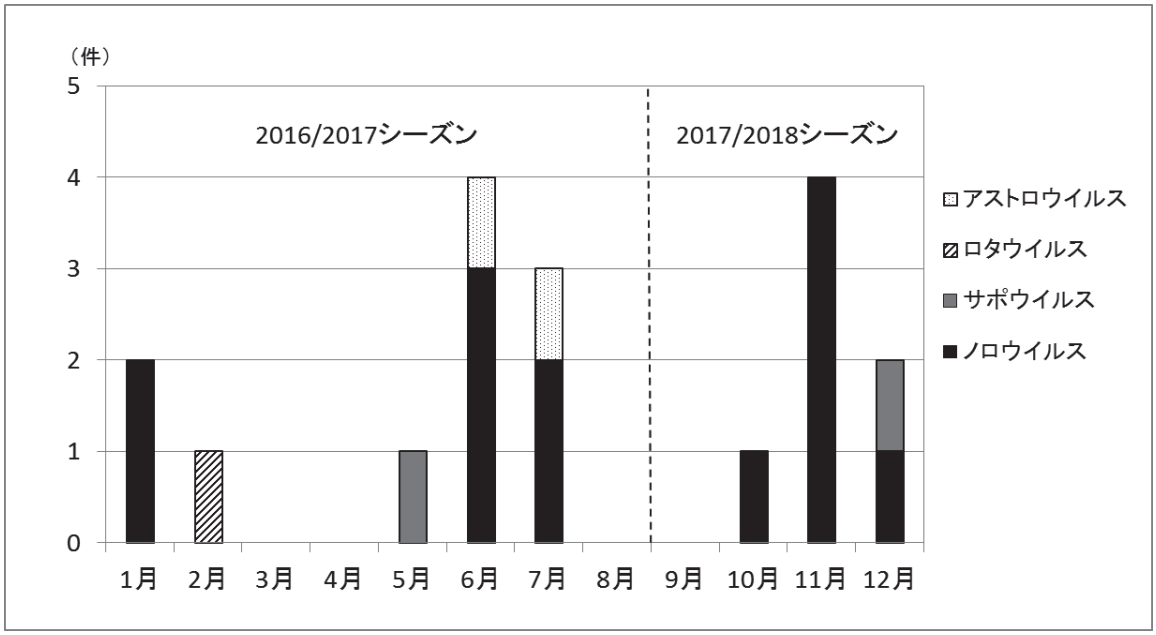


図３　感染性胃腸炎発生事例数

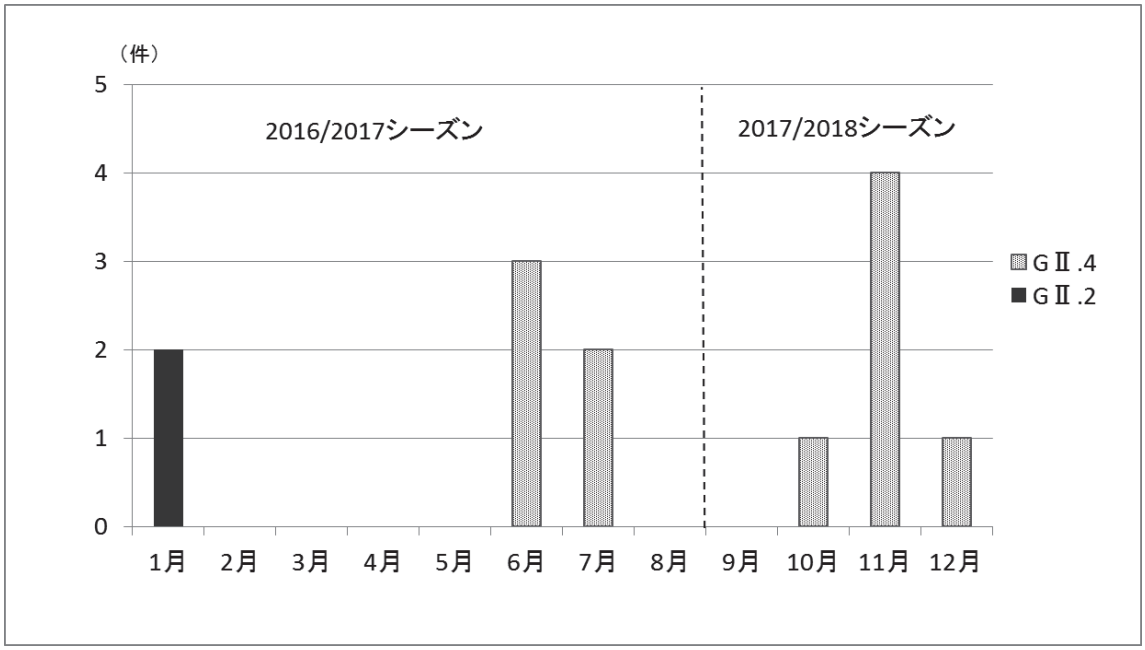


図 4 NoV による感染性胃腸炎集団発生事例数

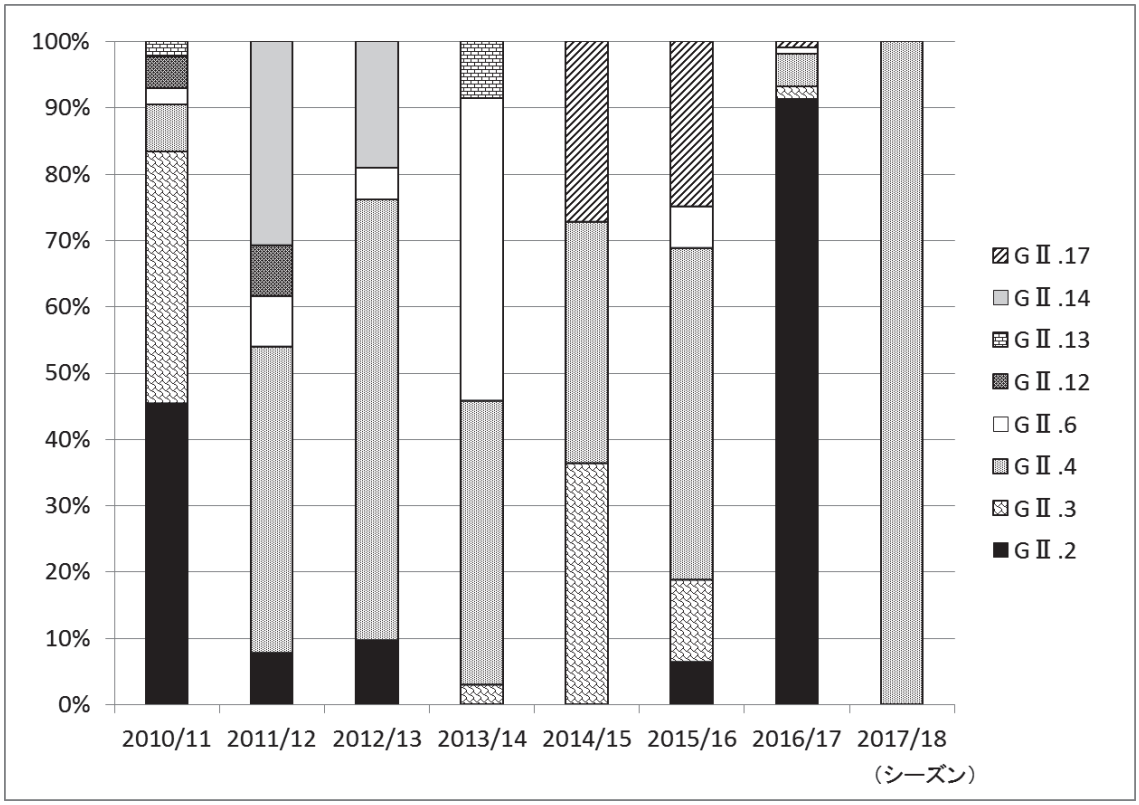


図 5　今シーズンと過去 7 シーズンに検出された NoVGⅡ群の遺伝子型

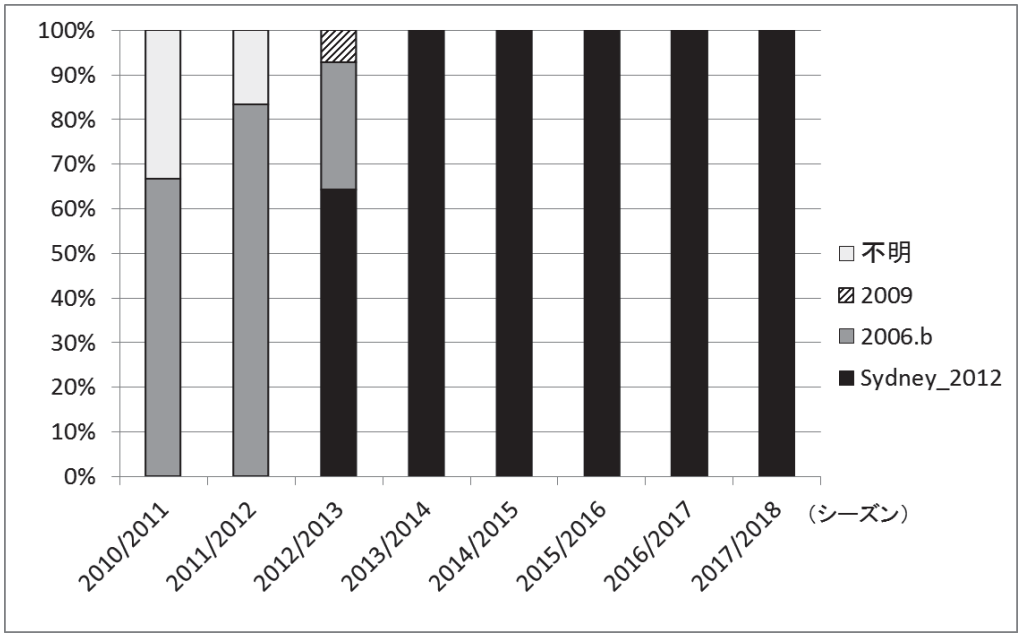


図 6　今シーズンと過去 7 シーズンに検出された GⅡ.4 亜型

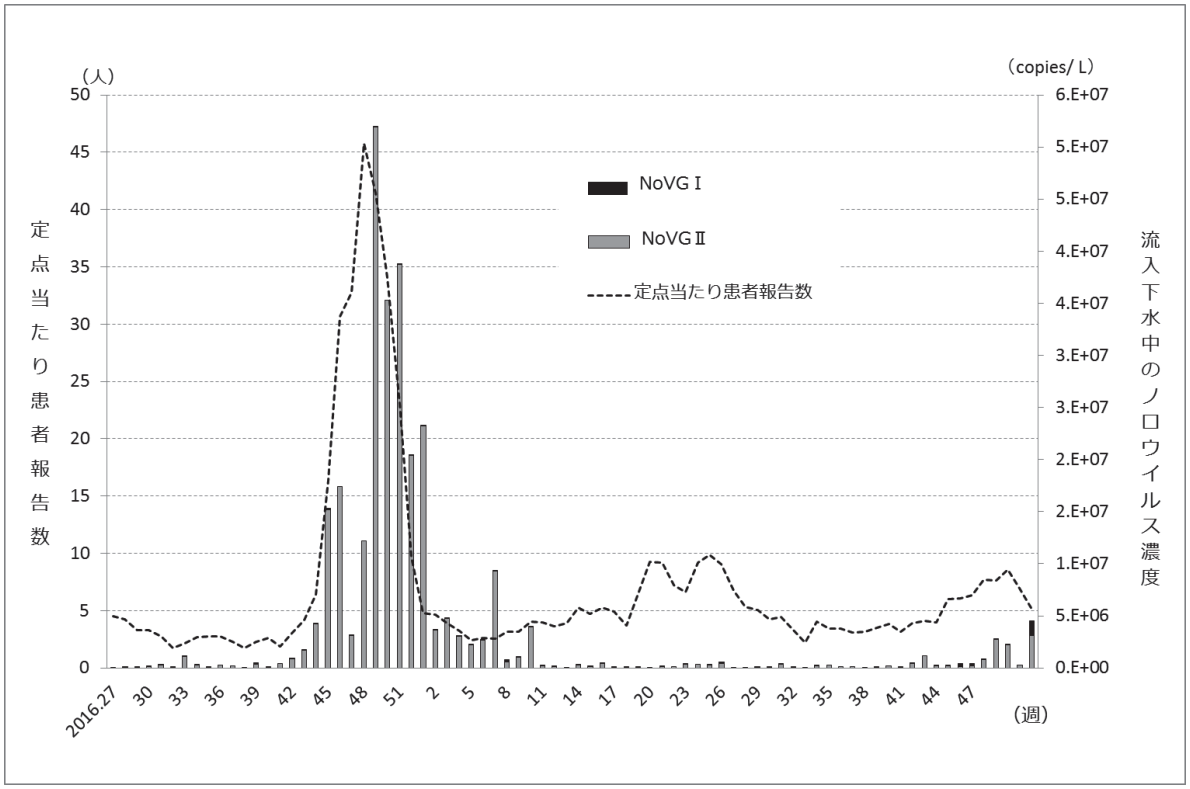


図 7　感染性胃腸炎患者報告数と流入下水中の NoV 濃度推移

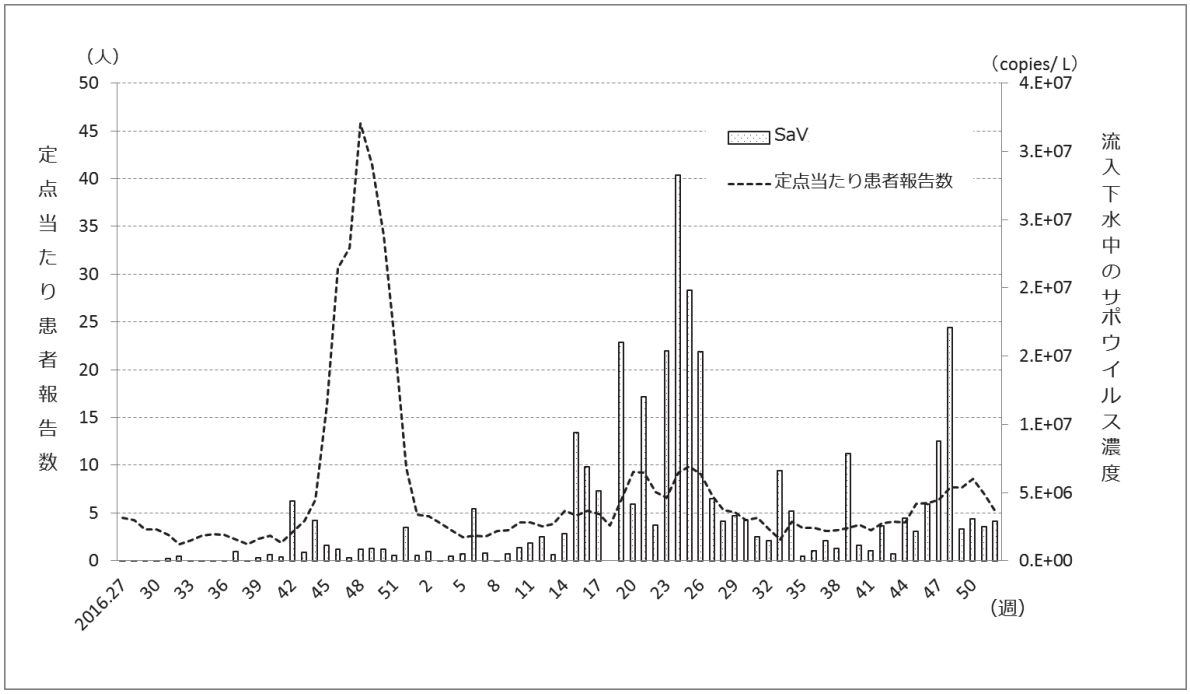


図 8　感染性胃腸炎患者報告数と流入下水中の SaV 濃度推移

平成 29 年度厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)
「ウイルスを原因とする食品媒介性疾患の制御に関する研究」
研究協力報告

水溶性高分子ポリマーコーティングによる手指汚染の水洗いによる簡易除去（第二報）

研究協力者	田村　務	新潟県保健環境科学研究所
	林　真由美	新潟県保健環境科学研究所
	広川　智香	新潟県保健環境科学研究所
	新井　礼子	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。ノロウイルスの代替ウイルスとして、大腸菌の MS2 ファージを使用して、汚染前の水溶性高分子ポリマーによる手指のコーティングが、手洗い後に手に残存するウイルス汚染を減らす効果があるかどうか評価した。

3 人の被験者の左右それぞれの手を 2×10^7 個のファージで汚染し､次の４つの試験、A：手洗い無し、B：水のみの手洗い、C：ハンドソープによる手洗い、D： 3%カルボキシメチルセルロースの 45%エタノール液（CMC 液）によるコーティング後にファージで汚染し水洗い、を実施して、手に残ったファージをグローブジュース法で回収し、回収したバッファー中のファージ濃度を定量した。回収液中のファージ濃度の平均は、A：623pfu/ml、B：27.6pfu/ml、C:42.6pfu/ml、D:2.2pfu/ml と、D が最も濃度が低かった。

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

A.　研究目的

調理従事者等からの食品の汚染は手指を介して汚染することが多いと考えられ、厳重な手洗いの方法が周知されている。しかし推奨されている手洗い方法は時間や手間を要し、それを日々実践することは容易ではない。

手指がウイルスに汚染される機会とし

て最も多いのはトイレと考えられ、特に自分のお尻を拭く際に手指を汚すことが多いと考えられる。

お尻を拭く作業を汚染作業と考えると、その前に手袋をして行う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ないかと考え、検討を行った。

昨年度の研究では、水溶性高分子ポリマーのカルボキシメチルセルロースとポリエチレングリコール6000で指をコーティングすることで、墨汁やノロウイルスを流水のみで容易に除去できることが確認された。

そこで、今年度は手全体を用いて、安全な大腸菌 MS2 ファージをノロウイルスの代替ウイルスとして汚染ウイルスに使用し、水溶性高分子ポリマーによるコーティングの手洗いにおける有効性を検討した。

B. 研究方法

1. 材料

使用したファージの調製

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

E.coli の増殖用培地として、Bacto Trypton(DIFCO) ; 1g、D(+)グルコース ; 0.1g、NaCl ; 0.8g、$CaCl_2.2H_2O$; 0.03g、$MgSO_4.7H_2O$;0.015g を蒸留水 100ml に溶解し、121℃15 分オートクレーブ滅菌したブイヨン (以下、トリプトブイヨン) を使用した。

トリプトブイヨンにE.coli を接種して約 6 時間程度培養後、MS2 ファージを接種して一晩培養した。これを 9000rpm 10 分遠心後、上清を回収し、1.2μm、0.22μm、0.1μm のフィルターで順次ろ過した。この上清に 10ml あたり PEG6000 ; 1.2g、NaCl ; 0.58g を加えて溶解後、2 時間冷蔵静置した。これを 10000rpm 30 分遠心して上清を除去し、沈査を 0.5% ウシ血清アルブミン加 PBS(-) (以下、BSA 加 PBS(-)) に浮遊させ、再度 0.22μm のフィルターでろ過して原液とした。

この原液を 10 倍段階希釈してプラーク法により、濃度を算定したところ、原液は 2.8×10^{11}pfu/ml の濃度であった。

これを 0.5%BSA 加 PBS(-)で、5×10^{5}pfu/μl に希釈して塗布用原液とした。

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

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

3. 方法 2　被験者の手の前処理と MS2 フ

ァージの汚染

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

被験者 3 名の左右の両手を使用した。試験前の手の準備として、①抗菌性物質を含まない石鹸で手を洗い、1分以上流水で流した。②ペーパータオルで水分を除去し、乾燥させた。③1.5mlの70%エタノールを手にとり、両手全面に広げて十分乾燥させたのち、試験を行った。

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

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

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

5. 方法 4　MS2 ファージによる手指汚染と手洗い試験

以下の A から D の試験を次の条件で実施した。各試験は、1 日 1 回として、1 日以上の間をあけて行った。手洗いは、25℃の水温で、1 分間で 2 l の水流で 20 秒洗浄することとした。

試験A:ファージ液を手に塗布し乾燥後GJ法で回収した。

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

試験C：ファージ液を手に塗布後、市販の泡状ハンドソープ1押しを片手に付け、両手全体に伸ばしてこすった後手洗いし、ペーパータオルで水分を除去した後GJ法で回収した。

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

（倫理面への配慮）

手指汚染の実験に参加した3名に、MS2ファージはヒトへの感染力は無いことを説明し、承諾を得たうえで実験した。

C.　研究結果

AからDの各試験で、GJ法によりそれぞれ片手から回収されたバッファー中のファージ濃度の結果を表1にまとめた。ファージを塗布後すぐにGJ法で回収する試験Aでは、回収バッファー1ml中のファージ濃度は、片手平均で623pfu/mlで、40ml

中の総量は 2.5×10^4pfu であった。汚染したファージの総量が 2×10^7 pfu であることから考えると、回収率は 0.13%と非常に少なかった。

水のみの手洗い試験 B では、回収したバッファー中のファージ濃度は、片手平均 27.6pfu、ハンドソープ手洗い試験 C では、回収したバッファー中のファージ濃度は、片手平均 42.6pfu で、水洗いのみのほうが回収ファージ量が少なかった。

CMC 液でコーティングした後ファージで汚染し、水洗いした試験 D では、回収バッファー中のファージ濃度は 2.2pfu/ml と最も低い濃度であった。

試験 D と A～C の試験における 3 人の左右の手から回収したバッファー中のファージ濃度について、t-検定を行ったところ、危険率 0.01%で有意差があることが確認された。

D. 考察

A を対照とすると、B と C の試験では、概ね 1 オーダー低く、D は更に B と C より 1 オーダー低い成績となり、CMC 液によるコーティングを行った手からのファージの回収量が最も少なく、CMC 液によるコーティングが手に残るファージ量を最も少なくする方法であることがわかった。

水洗いのみの試験 B より、ハンドソープで洗った試験 C の回収バッファー中のファージ濃度が高い傾向となった。これは、ハンドソープの使用により、グローブジュース法によるその後の回収の際に、手に付いたファージが落ちやすくなったためではないかと考えられた。

しかし、試験 A によるファージの回収率が 0.13%と非常に低く、ファージが手に残っているのか、あるいはその後の処理中に物に吸着されるのか不明であり、追加試験によって手に付着している量を明らかにする必要がある。これらの実験条件を整えて、手指に付いたファージの量を正確に評価する方法を検討して、再度 CMC 液の有効性を評価する必要がある。

また、実施した試験 A から D は 1 回のみであることから、繰り返し実施する必要がある。

E. 結論

CMC 液による手指のコーティング法は、水やハンドソープを用いた手洗いより、手に残るファージの量を 1/10 にすることが確認された。

F. 研究発表

1. 論文発表
   無し
2. 学会発表
   無し

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　試験 A から D における GJ 法による回収バッファー中のファージ濃度

		被験者						(pfu/ml) 平均	SD
		1		2		3			
		左手	右手	左手	右手	左手	右手		
試験A	ファージ塗布後回収	545	1170	390	990	205	435	623	375
試験B	水洗のみ	21.9	22.4	17.5	35.6	22.9	45.3	27.6	10.6
試験C	ハンドソープ手洗い	44.4	99.6	26.0	31.8	16.9	36.8	42.6	29.5
試験D	CMCコーティング後水洗い	2.8	6.0	1.3	1.5	1.0	0.3	2.2	2.1

平成 29 年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
「ウイルスを原因とする食品媒介性疾患の制御に関する研究」
研究協力報告

東京都内におけるノロウイルスを原因とした食中毒疑い事例等での遺伝子型解析（2016/17 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	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	新開　敬行	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

2016/17 シーズンの東京都におけるノロウイルス(NoV)を原因とした食中毒疑い等の集団発生事例 210 例において、検出された遺伝子型を解析した。その結果、GII.2 が 65.7%（138/210）の事例から検出され最多となり、次いで GII.17 が 11.9%(25/210)、GII.4 が 9.0%(19/210)から検出された。NoV の検出はシーズン当初の 11 月から急激に増加し 12 月に検出がピークとなった。2017 年 2 月には、学校給食で提供された「刻みのり」を原因とした大規模な食中毒が東京都内で 4 事例発生したが、その遺伝子型は GII.P17_GII.17 であり事例間および刻みのりと患者間でその配列は一致した。本事例においては、遺伝子解析による相同性の確認が解決の一助となったと考えられた。

A. 研究目的

ノロウイルス(NoV)は代表的な胃腸炎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、2016/17 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

2016/17 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 210 事例の患者糞便等から抽出した RNA を材料とした。

2. 方法

VP1 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 により遺伝子型を分類した。GII.2 については *RdRp* 領域の解析も実施した。

（倫理面への配慮）

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

C. 研究結果

遺伝子型別検出状況を見ると、GII.2 が 65.7%（138/210）の事例から検出されシーズンを通して最多となった。*RdRp* 領域の解析により検出された GII.2 は全て GII.P16_GII.2（GII.2 変異株）であることが明らかとなった。GII.2 は保育園等の小児集団での事例から多く検出されたが、2016 年 12 月に発生したパーティー参加者 76 名が発症した食中毒事例や 2017 年 1 月に特別養護老人ホーム 2 か所で発生した食中毒事例等の成人からも検出された。

一方、前シーズンおよび前々シーズンでは最多検出型となっていた GII.17 は、2016/17 シーズンには検出割合が 11.9%(25/210)にまで減少したが、2017 年 2 月に東京都内で発生した学校給食で提供された「刻みのり」を原因とした食中毒 4 事例においては GII.17 が検出された。

このほかに、GII.4 が 9.0%(19/210)、GII.6 が 4.3%(9/210)から検出された。GI は 3 事例、GI と GII の両方が検出された事例は 4 事例であった。

D. 考察

東京都において 2016/17 シーズンでは GII.2 が主要流行遺伝子型となったが、病原微生物検出情報(国立感染症研究所) によると、2016/17 シーズンでは GII.2 は最多検出数となっており、全国的な傾向であったと考えられる。検出された GII.2 は全て GII.2 変異株であったが、ドイツや中国等からも GII.2 変異株によるアウトブレイクが報告されており、新たな変異株が世界各国で流行していたと考えられる。過去において、新規遺伝子や変異型の出現は大規模な NoV 流行を引き起こしていることから遺伝子型については今後とも注視すべきである。

2017 年 2 月に発生した「刻みのり」食中毒(4 事例合計での喫食者は 4,209 名、患者は 1,193 名)は意外な食材を原因としていたことや, 規模の大きさなどから社会的関心も高い事例となった。 GII.17 が流行していない状況下で 4 事例ともに GII.17 が原因ウイルスであり、その塩基配列が事例間ならびに刻みのりと患者の間でも一致したことも感染源を特定する有力な根拠の一つとなった。また、本事例に関しては、同一刻みのりの関与した事例が複数の自治体においても発生していたことが確認されたが、遺伝子型の一致が関連を探知する根拠の一つとなった。厚生労働省通知「食中毒対策の推進について」(平成 28 年 4 月 1 日付け生食監発 0401 第 1 号)にもあるように、NoV 食中毒において遺伝子型等の分子疫学情報の充実は原因究明や予防をより一層推進する上で必要である。今後は、単一事例内の感染源の特定だけにとどまらず、「広域に散在」している可能性がある複数事例の感染源究明に向け、分子疫学的情報を活用し事例間の関連性の有

無を迅速に察知できるようなシステム構築が必要と思われる。そのような観点においても、今後、遺伝子解析が NoV 食中毒予防に果たす役割について様々な角度から検証を試みたい。

E. 結論

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

F. 研究発表

1. 論文発表

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

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

2. 学会発表

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

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 実特許取得：なし
2. 用新案登録：なし
3. その他：なし

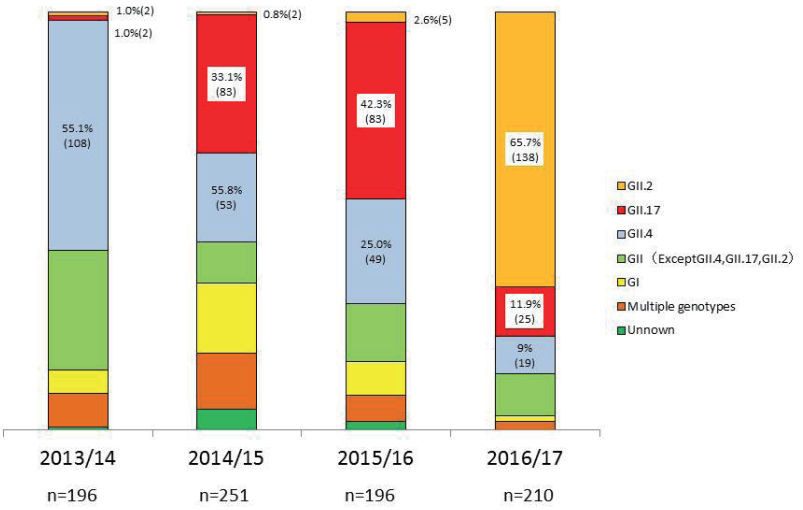


図 検出されたNoV遺伝子型の割合
（2013/14～2016/17ｼｰｽﾞﾝ、東京都）

平成 29 年度厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)
「ウイルスを原因とする食品媒介性疾患の制御に関する研究」
研究協力報告

川崎市における二枚貝のノロウイルス検出状況

研究協力者	清水　智美	川崎市健康安全研究所
研究協力者	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

川崎市内の河川に生息する二枚貝及び市内で流通する二枚貝についてノロウイルス（NoV）検査を行い、ヒトでの流行遺伝子型との関連性について調査した。平成 29 年 8 月及び 10 月に採取した河川のシジミから NoV GII.2、GII.4 及び GII.17 が検出され、近年のヒトでの主流遺伝子型と一致することが確認された。一方 GI 群については、ここ数シーズンではヒトからほとんど検出されていないが、河川のシジミからは一定数の検出がみられた。平成 29 年 8 月、10 月及び 12 月に市内で購入した市販のシジミの NoV 保有率は 5.6%と比較的低かったものの、生食又は加熱不十分な状態で喫食することによって NoV に感染するリスクがあることが確認された。また、平成 29 年 10 月及び 12 月に市内で購入した市販の生食用生カキの 25.0%から遺伝子型別不能の GI が検出された。遺伝子型が割り当てられていないことから、報告数が稀な株であり、ヒトには感染しない又はヒトに対して病原性を持たないことが推測されるが、今後ヒトへの感染例が報告される可能性があるため、詳細に解析する必要があると考えられる。本研究は長期にわたり調査する必要があるため、今後も定期的に二枚貝を採取し、NoV の検査を継続して行い、データを蓄積することが重要であると考える。

A.　研究目的

ウイルス性食中毒は、ウイルスに汚染された食品を喫食することによって引き起こされる。ウイルスに汚染された河川水や海水をろ過し、中腸腺中にウイルスが蓄積・濃縮した二枚貝を、生食又は加熱不十分な状態で喫食することによる食中毒事例が、絶えず報告されている。

本研究は、二枚貝のノロウイルス（NoV）保有率や保有遺伝子型の把握を目的とし、川崎市内の河川に生息する二枚貝及び市内で流通する二枚貝について NoV 検査を行った。また、ヒトでの流行遺伝子型と比較を行い、関連性について調査した。

B. 研究方法

1. 材料

(1) 市内の河川に生息するシジミ

平成 29 年 8 月及び 10 月に市内河川の干潟にて採取したシジミを材料とし、各月 12 検体ずつ NoV の検査を行った。

(2) 市内流通のシジミ

平成 29 年 8 月、10 月及び 12 月に 1 パックずつ購入したシジミを材料とし、1 パックにつき 12 検体の検査を行った。なお、10 月及び 12 月のシジミの産地は同一県であった。

(3) 市内流通の生食用及び加熱用生カキ

平成 29 年 10 月及び 12 月に 1 パックずつ購入した生食用及び加熱用生カキを材料とし、1 パックにつき 6 検体の検査を行った。なお、生食用の産地及び加熱用の産地はそれぞれ同一県であった。

(4) 市内における NoV 検出状況

平成 25 年 9 月から平成 30 年 1 月までの期間に当所において NoV 陽性となった食中毒及び感染症集団発生事例を対象とした（202 事例）。

2. 二枚貝からの NoV 検出

(1) 二枚貝からのウイルス濃縮

二枚貝 1 個体を 1 検体とした。食品のウイルス標準試験法検討委員会「二枚貝（カキ）からのウイルスの濃縮法（ポリエチレングリコールによる濃縮法）」を参考に、二枚貝の中腸腺を取り出し、9 倍量のα－アミラーゼ（和光純薬）/PBS 液 （2.8 mg/mL）を加えて 10%乳剤を作製した。15 分ごとに攪拌しながら 37℃の恒温器中で 1 時間静置したのち、10,000 rpm、20 分間冷却遠心した。その後は、厚生労働省通知法「貝の中腸腺を用いる方法（ポリエチレングリコールによる濃縮方法）」に準じ、遠心上清にポリエチレングリコール 6,000 を 8%、NaCl を 2.1 g/100 mL になるように加えて軽く攪拌し、4℃の冷蔵庫に一晩静置し、10,000 rpm、20 分間冷却遠心した沈渣を 300 μL の DDW で再浮遊させ濃縮した。

(2) NoV の検査

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

（倫理面への配慮）

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

C. 研究結果

1. 河川のシジミの NoV 保有状況

24 検体中 6 検体から NoV が検出された（保有率 25.0%）。8 月に採取したシジミのうち 1 検体からは GI.3 と GII.17 が混合で検出され、2 検体からは GII.4 が検出

された。10 月採取のシジミからは、GI.3、GII.2 及び GII.4 が 1 検体ずつ検出された（表 1)。

2. 市販のシジミの NoV 保有状況

36 検体中 2 検体から NoV が検出された（保有率 5.6%)。2 検体ともに 12 月購入のシジミであり、遺伝子型は GII.17 であった。8 月及び 10 月購入のシジミからは NoV が検出されなかった（表 2)。

3. 市販の生食用生カキの NoV 保有状況

12 検体中 4 検体から NoV が検出された（保有率 33.3%)。10 月購入の 2 検体及び 12 月購入の 1 検体から、塩基配列がほぼ一致する GI が検出されたが、既知の遺伝子型に分類されなかった。また、12 月購入の 1 検体から GII.17 が検出された（表 3)。

4. 市販の加熱用生カキの NoV 保有状況

加熱用生カキから NoV は検出されなかった（保有率 0.0%）（表 4)。

5. 市内における NoV 検出状況

2013/14 シーズンの主流遺伝子型は GII.4(51.0%)及び GII.6(27.5%)、2014/15 及び 2015/16 シーズンでは GII.4(34.3%, 24.4%)及び GII.17(23.9%, 34.1%)が主流であった。2016/17 においては GII.2 が 60.7%を占め、2017/18 シーズンは 1 月までの時点で GII.2(60.0%)が優勢であった（図 1)。

D. 考察

河川のシジミから NoV GII.2、GII.4 及び GII.17 が検出され、近年のヒトでの主流遺伝子型と一致することが確認された。一方 GI 群については、24 検体中 2 検体（8.3%）で検出がみられた。検出された遺伝子型は 2 検体ともに GI.3 であった。NoV GI は当市においてここ数シーズンではヒトからほとんど検出されていない。2015 年夏期にヒトから複数の GI.3 が検出されたが、今回シジミから検出された GI.3 とは塩基配列が明らかに異なっていた（未公開データ)。そのため、当所では把握していない NoV GI.3 患者の発生又は不顕性感染の可能性等が推測される。

市販のシジミの NoV 保有率は 5.6%と比較的低かったものの、生食又は加熱不十分な状態で喫食することによって NoV に感染するリスクがあることが確認された。シジミは加熱して喫食することがほとんどであるが、十分な加熱を施さない調理方法もあるため、注意が必要である。

市販の生食用生カキの 25.0%から遺伝子型別不能の GI が検出された。遺伝子型が割り当てられていないことから、報告数が稀な株であり、ヒトには感染しない又はヒトに対して病原性を持たないことが推測される。しかしながら今後ヒトへの感染例が報告される可能性があるため、詳細に解析する必要があると考えられる。

本研究は長期にわたり調査する必要があるため、今後も定期的に二枚貝を採取し、NoV の検査を継続して行い、データを蓄積することが重要であると考える。

E. 結論

- 河川のシジミから、近年のヒトでの主流遺伝子型である GII.2、GII.4 及び GII.17 が検出された。
- GI はヒトからの検出が少ないが、河川のシジミからは一定数の検出がみられた。

・市販のシジミの NoV 保有率は 5.6%と比較的低かったものの、生食又は加熱不十分な状態で喫食することによって NoV に感染するリスクがあることが確認された。
・生食用生カキから遺伝子型別不能の GI が検出された。
・今後も定期的に二枚貝を採取し、データを蓄積する必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表：なし
2. 学会発表：なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

表 1　河川のシジミにおける NoV 保有状況

採取月	検体数	陽性数	陽性率	遺伝子型
8 月	12	3	25.0%	GI.3 と GII.17（混合） GII.4 GII.4
10 月	12	3	25.0%	GI.3 GII.2 GII.4
total	**24**	**6**	**25.0%**	

表 2　市販のシジミにおける NoV 保有状況

採取月	検体数	陽性数	陽性率	遺伝子型
8 月	12	0	0.0%	
10 月	12	0	0.0%	
12 月	12	2	16.7%	GII.17 GII.17
total	**36**	**2**	**5.6%**	

表 3　市販の生食用生カキにおける NoV 保有状況

採取月	検体数	陽性数	陽性率	遺伝子型
10 月	6	2	33.3%	GI 型不明 GI 型不明
12 月	6	2	33.3%	GI 型不明 GII.17
total	**12**	**4**	**33.3%**	

表 4　市販の加熱用生カキにおける NoV 保有状況

採取月	検体数	陽性数	陽性率	遺伝子型
10 月	6	0	0.0%	
12 月	6	0	0.0%	
total	**12**	**0**	**0.0%**	

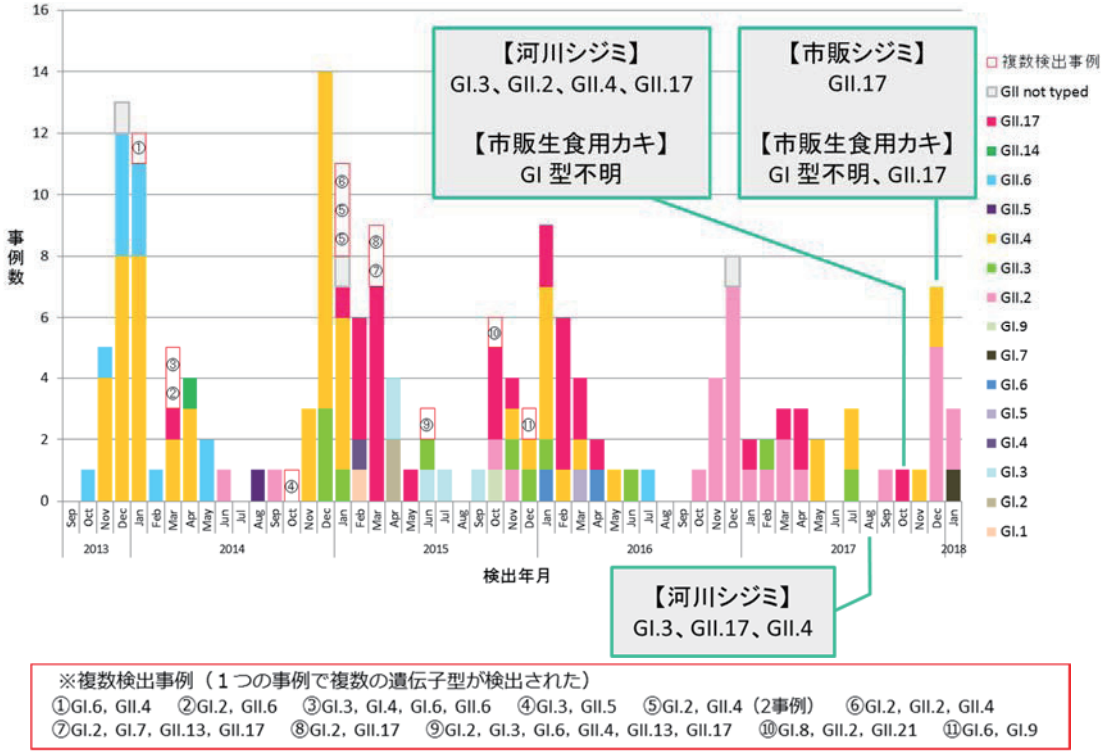


図 1　市内における NoV 検出状況（2013.9～2018.1）

平成 29 年度厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)
「ウイルスを原因とする食品媒介性疾患の制御に関する研究」
研究協力報告

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

研究協力者	入谷　展弘	大阪健康安全基盤研究所
研究協力者	山元　誠司	大阪健康安全基盤研究所
研究協力者	改田　厚	大阪健康安全基盤研究所
研究協力者	阿部　仁一郎	大阪健康安全基盤研究所
研究協力者	久保　英幸	大阪健康安全基盤研究所
研究分担者	野田　衛	国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

施設フキトリまたは調理従事者からノロウイルス（NoV）が検出された食中毒（疑いを含む）を対象に、患者由来 NoV との遺伝子解析を実施したところ、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。特に食品が汚染されてから約 2 か月後に起こった広域発生の食中毒では、施設フキトリ由来 NoV の遺伝子解析結果が汚染経路の解明につながる科学的根拠となった。

2017 年（1～12 月）は大阪市において集団胃腸炎 46 事例が NoV 陽性となった。最も多く検出された遺伝子型は GII.4（17 事例、37.0%）であり、すべて Sydney_2012 亜型であった。次いで GII.2（16 事例、34.8%）であった。GII.4 事例のほとんどは 5 月以降の発生であり、GII.2 事例は主に 1～3 月の期間に発生していた（12 事例、75.0%）。

2017 年 12 月に購入した市販の生食用カキに NoV 汚染は認められなかった。

A. 研究目的

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

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

NoV の検索および遺伝子型別を行った。

B. 研究方法

1. 材料

1) 施設フキトリ由来 NoV の遺伝子解析

NoV 食中毒推定原因食品の加工を行った一施設のフキトリ 25 か所を対象とした。

2) 調理従事者由来 NoV の遺伝子解析

2017 年 1 月～2018 年 1 月の期間に、患者および原因施設調理従事者から NoV が検出された食中毒（疑いを含む）6 事例を対象とした。

3) 胃腸炎事例から検出された NoV の分子疫学的解析

2017 年 1～12 月に当研究所へ検査依頼のあった集団胃腸炎 73 事例を対象とした。

4) 生食用カキの NoV 汚染調査

2017 年 12 月に市販されていた生食用カキ 3 ロットを NoV の検索に用いた。3 ロットは 2 県 3 海域から採取されたものであった。

2. 糞便材料からの NoV 検出

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

3. フキトリからの NoV 検出

フキトリ水は全量約 9ml を 50,000rpm 60 分間遠心した沈渣に 0.2ml の 0.5% Zwittergent 加 PBS(-)を加え、RNA 抽出用試料とした。

ウイルス RNA は、QIAamp Viral RNA Mini Kit を用いて抽出した。cDNA は Random hexamer および SuperScript III 逆転写酵素 (Thermo Fisher Scientific)を用いて合成した。

NoV 遺伝子の検出は糞便と同じ方法で行った。

4. 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) に入れて破砕した後、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℃で 60 分間撹拌した。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℃で 2 時間放置した。さらに 4℃ 10,000rpm 30 分間遠心した沈渣に 0.3ml の 0.5% Zwittergent 加 PBS(-)を加え、RNA 抽出用試料とした。

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

Scientific)および Random hexamer を用いて合成した。

NoV 遺伝子の検出は糞便と同じ方法で行った。

5. NoV の遺伝子型別

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

(倫理面への配慮)

本研究では、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. 施設フキトリ由来 NoV の遺伝子解析

8 か所から NoV が検出され、うち 6 か所はトイレ周辺であった（**表 1**)。フキトリ由来株と患者および食品由来株の遺伝子型および塩基配列を比較したところ、すべて一致した。1 か所（裁断機入口）では患者および食品由来株と同じ塩基配列以外に、1 塩基異なる塩基配列も認められた。フキトリ検体採取場所の NoV 汚染量（NoV RNA コピー数／検体）はトイレ取手（外）が最も高く、次いでトイレレバー、トイレ取手（内）であった。トイレ周辺以外の 2 か所では微量な汚染であった。

2. 調理従事者由来 NoV の遺伝子解析

6 事例それぞれについて調理従事者および患者由来株の遺伝子型および塩基配列を比較したところ、同一事例の両者はすべて一致した（**表 2**)。

3. NoV 胃腸炎事例の発生状況

46 事例（63.0%）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 25 事例、食中毒疑事例は 21 事例であった。PP 事例の主な原因施設は保育園（21/25 事例、84.0%）であった。食中毒疑事例は 1～3 月に多く発生していた（16 事例、76.2%）（**図 B**)。カキの喫食が関連していた事例は 1 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 は 6 種類（GI：2 種類、GII：4 種類）に遺伝子型別された。最も多く検出されたのは 17 事例（37.0%）から検出された GII.4 であり、すべて Sydney_2012 亜型であった。次いで GII.2（複数の遺伝子型が検出された事例を含めて 16 事例、34.8%）であった。GII.4 事例のほとんどは 5 月以降の発生であり、GII.2 事例は主に 1～3 月の期間に発生していた（12 事例、75.0%）（**図 A, B**)。

4. 生食用カキの NoV 汚染状況

検査したすべてのカキから NoV は検出されなかった。

D. 考察

病原体や感染経路の特定は、食中毒の判断を行う上で非常に重要な根拠となる。また、調理従事者からの汚染が原因として疑われる場合、施設フキトリや調理従事者と患者から検出された病原体の遺伝子型等が一致することは有力な判断材料になる。今回、食品が加工される際に汚

染されてから約 2 か月後に起こった広域発生の食中毒において、施設フキトリ検体から NoV を検出することができた。本事例では患者や食品由来株との遺伝子解析結果が汚染経路の解明につながる科学的根拠となった。施設フキトリ検査は汚染経路の解明や原因施設の特定に有効な手段となりうることが示された。また、調理従事者由来 NoV の遺伝子解析において、すべての事例で患者由来株と遺伝子型、塩基配列が一致していたことは調理従事者からの二次汚染が原因であったことを強く示唆している。事例番号 6（**表 2**）については、施設内で嘔吐の報告があり、判断が困難な事例であった。調理従事者と患者に由来する NoV の塩基配列は一致していたが、疫学的に嘔吐場所からの感染も否定できなかった。結果として、本事例では食中毒の判断には至らなかったが、検出された NoV の遺伝子解析結果は原因を特定する上で必要とされた。しかし、患者等からの検査を実施している中で、遺伝子解析を並行して行うことには作業場所、人員、コンタミネーション、コスト等の多くの課題があるため容易ではない。事例ごとに状況を考慮して遺伝子解析実施を判断する必要があると考えられた。

2017/18 シーズンは大阪府の感染性胃腸炎の定点あたり患者報告数が第 51 週でピーク（7.6）になり、大阪府では過去 10 年で最も低い値であった。大阪市内での集団事例の発生状況も同様に例年と比較して少なく、今のところ、NoV 流行は小規模である。検出される遺伝子型の割合は 2017 年 5 月以降 GII.4 Sydney_2012 が増加している。GII.4 の新しい亜型や稀な遺伝子型の検出は大流行につながる可能性があり、NoV 遺伝子型の変化や動向を引き続いて注意深く監視していく必要がある。

NoV 食中毒の原因食品のひとつである生カキ中の NoV 汚染状況を監視することは NoV 感染リスクを評価する上で重要であり、ヒトにおける NoV 流行予測にもつながる可能性がある。今回はすべての生食用カキから NoV は検出されなかった。今のところ、2017/18 シーズンは全国的に感染性胃腸炎の流行が低調であり、NoV の流行も同様であると考えられる。例年、この時期の市販生カキに NoV 汚染が認められることは多いが、今シーズンの NoV 流行状況がカキの NoV 検査結果に反映されたものと考えられた。

E. 結論

1. 食品が汚染されてから約 2 か月後に起こった広域発生の食中毒において、施設フキトリ由来 NoV の遺伝子解析結果が汚染経路の解明につながる重要な科学的根拠となった。

2. 2017/18 シーズンの大阪市における NoV 流行状況は、今のところ例年と比較して小規模である。

3. 12 月市販の生食用カキに NoV 汚染は認められなかった。

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，山元誠司，久保英幸，平井有

紀，野田　衛，小笠原　準：2016－2017シーズンに大阪市で認められたノロウイルス流行，大阪市立環境科学研究所報告調査・研究年報　79，1-4（2017）

2.　学会発表

１）入谷展弘，上林大起，改田　厚，阿部仁一郎，山元誠司，久保英幸，野田衛：2016/17 シーズンに大阪市で認められたノロウイルス GII.2 流行，第 65 回日本ウイルス学会，大阪（2017.10.24-26）

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　一施設のフキトリから検出されたNoVの遺伝子解析

検出箇所	遺伝子型	ウイルス量 (NoV RNA コピー数／検体)	患者・食品由来株との比較*	
			遺伝子型	塩基配列
トイレ取手（外）	GII.17	$1.4x10^5$	○	○
トイレ取手（内）	GII.17	$3.2x10^3$	○	○
便器内側	GII.17	$3.5x10^2$	○	○
トイレ便座	GII.17	$4.7x10^2$	○	○
トイレレバー	GII.17	$3.9x10^3$	○	○
トイレ床	GII.17	$7.7x10^2$	○	○
裁断機入口	GII.17	11	○	○**
作業場電話子機	GII.17	5	○	○

＊ ○：患者・食品由来株と同一

** 2種類のNoV遺伝子が検出された。一つは患者・食品由来株と同一であり、
もう一つは1塩基の相違が認められた（99.7%の塩基配列相同性）

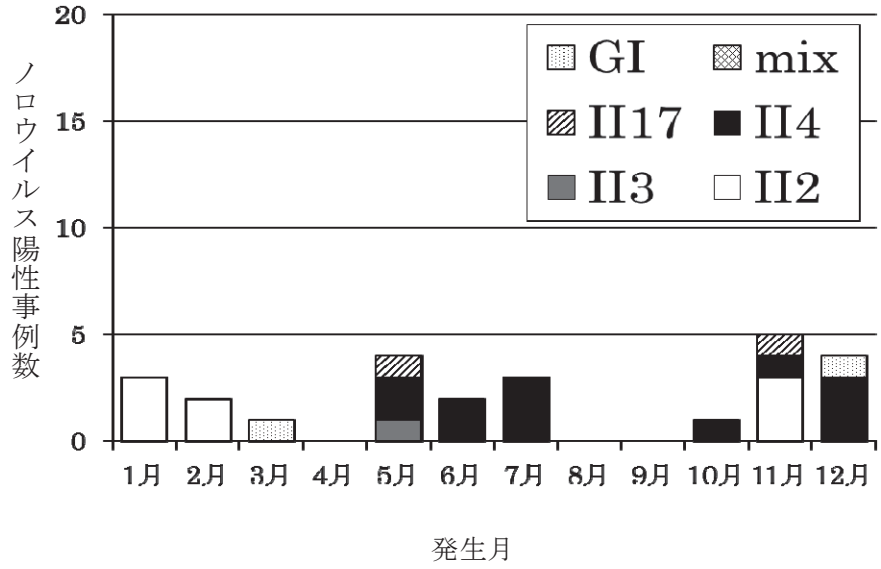
表２　調理従事者および患者から検出されたNoV遺伝子の比較

事件番号	発生場所	推定原因	患者			調理従事者			
			検査数	陽性数	遺伝子型	検査数	陽性数	患者由来NoVとの比較*	
								遺伝子型	塩基配列
1	飲食店	食品	3**	3**	GII.4	3	1	○	○
2	飲食店	食品	3	3	GII.2	4	4	○	○
3	飲食店	食品	3	3	GII.17	2	1	○	○
4	飲食店	食品	12	5	GII.17	5	1	○	○
5	飲食店	食品	4	4	GII.4	6	1	○	○
6	飲食店	不明	25**	15**	GII.2	9	1	○	○

＊ ○：患者由来株と同一

** 他自治体の検査結果を含む

A



B

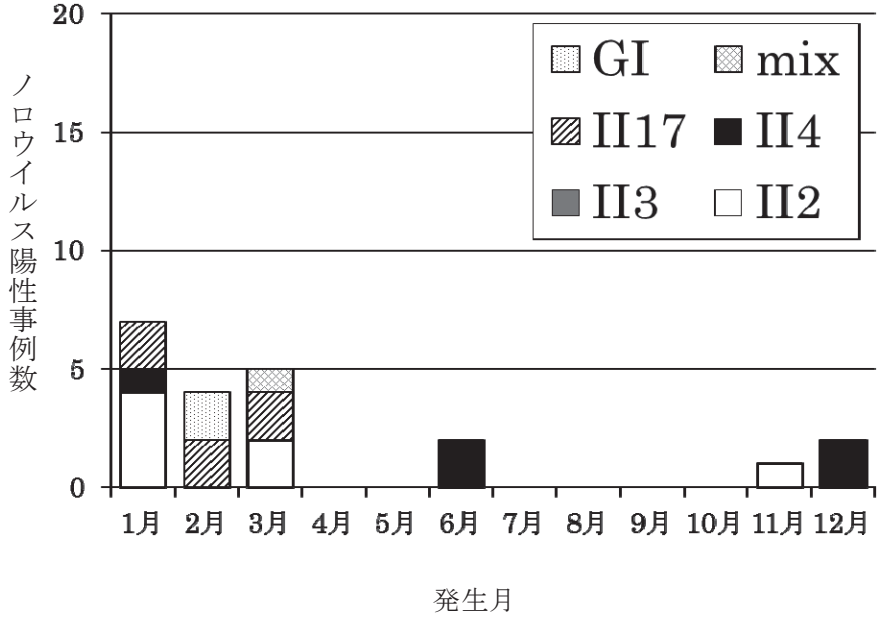


図　大阪市における NoV 事例発生状況（2017 年）
A, ヒトからヒトへの感染疑事例
B, 食中毒事例（疑いを含む）
mix：複数の遺伝子型が検出された事例

平成 29 年度厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)
「ウイルスを原因とする食品媒介性疾患の制御に関する研究」
研究協力報告

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

研究協力者	三好　龍也	堺市衛生研究所
研究協力者	中谷　誠宏	堺市衛生研究所
研究協力者	岡山　文香	堺市衛生研究所
研究協力者	福井　陽子	堺市衛生研究所
研究協力者	内野　清子	堺市衛生研究所
研究協力者	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

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

ふき取り調査では、31 施設の 179 検体から NoV 遺伝子検出を試みたが、NoV 遺伝子は検出されなかった。模擬サンプルを用いたふき取り検査の NoV 遺伝子検出期間に関する検討では、汚染後 1 ヶ月以上検出されることが考えられた。

下水サーベイランスでは、NoV については、臨床サンプルと下水サンプルから得られた結果は、よく相関していた。その他のサポウイルス等については、臨床サンプルからの検出頻度は低かったが、下水サンプルからは高頻度に検出された。臨床と環境の両面からウイルス遺伝子を検出・解析することによって、腸管感染ウイルスの流行状況の全体像を把握することが可能と考える。

これらの解析結果は、NoV 等のウイルス性食中毒や感染症の予防対策を考える上で、有用な情報を与えると考える。

A.　研究目的

ノロウイルス（NoV）食中毒は、調理従事者等による食品汚染を原因とした事例が多く、不顕性感染者が発端となることも多くある。しかしながら感染経路等の詳細について不明な点が多い。また、NoV のふき取りについては、検査法や検出感度等の課題がある。

調理施設における NoV の汚染状況や不顕性感染も含めた調理従事者における NoV の感染実態を明らかにすること及びふき取り検査法の検討を行うため、調理施設のトイレ等のふき取り調査を行った。

一方、下水中に含まれるウイルスは、カキなどの二枚貝の重要な汚染源であり、それらを解析することは、カキなどの汚染源の調査やカキ等を原因とする食中毒の解析にも寄与すると考えられる。

食中毒対策の一助とするために、食中毒や感染性胃腸炎の散発・集団発生から得られた患者便等の臨床面と下水処理場の流入水の環境面の両面から NoV の流行状況を調査し、NoV 流行を解析した。

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

B. 研究方法

1. ふき取り調査

1-1 材料

5 名以上の調理従事者が在籍している調理施設の調理従事者用トイレ等（調理施設内の冷蔵庫の取っ手、物資搬入口のドアノブ、調理従事者専用トイレのドアノブ、照明スイッチ、手洗い蛇口栓、水洗レバー、便器（便座の裏側又は便器の内側））をふき取り対象とし、31 施設の 179 検体を調査材料とした。ふき取りは、2017 年 10 月～2018 年 1 月に実施した。

1-2 方法

ワイプチェック TE-302 （佐藤化成工業所）のリン酸緩衝生理食塩水 10mL を 1mL に減量したものを用いてふき取り、「ノロウイルス拭取り検査用試薬キット」（島津製作所）を用いて、添付文書に従い NoV 遺伝子検出を行った。

また、ふき取り検査の検出期間の検討を行うため、スライドガラスに NoV を塗布、風乾後 20℃で保管し、風乾直後、1 週間、2 週間、1 ヶ月後（n=3）に上記の方法で NoV 遺伝子検出を行った。

2. 下水サーベイランス

2-1 材料

環境サンプルとして、2015 年 1 月から 2017 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）49 例を調査対象とした。

2-2 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(0.45μm)でろ過し、ウイルスをフィルターに吸着させた。フィルターを細断し、pH10.5 グリシン buffer（流入水：5.0ml、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。

2-3 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. ふき取り調査結果

1-1 トイレ等のふき取り調査結果

31 施設から採取した 179 検体において、NoV 遺伝子は検出されなかった。

1-2 ふき取り検査の検出期間の検討

1 週間、2 週間、1 ヶ月後のすべてのサンプルで NoV 遺伝子が検出された。Ct 値についても大きな変化はみられなかった（図 1)。

2. 下水サーベイランス結果

2-1 NoV 遺伝子検出結果

2017 年は、臨床サンプルから GI で 4 種類(GI.1, 2, 3, 4)、GII で 4 種類(GII.2, 4, 6, 17）計 8 遺伝子型の NoV が検出された（図 2)。

下水サンプルでは、GI で 6 種類（GI.1, 2, 3, 4, 6, 7)、GII で 7 種類（GII.2, 3, 4, 6, 13, 17, 21）計 13 遺伝子型が検出された。GII.2, GII.4 型が多く検出された（表 1)。

2-2 下水中の NoV 遺伝子定量測定結果

下水中の遺伝子量は、NoV GI、GII とも 12 月、1 月にピークがみられた。 GII の遺伝子量は、GI より約 10 倍多かった（図 3)。2016/17 シーズンは、堺市内の感染性胃腸炎の患者報告数が 12 月に定点あたり 10 を超え、過去 5 年間で最も多くなり、下水中の NoV 遺伝子量（GII）も同様に 1 月に過去 5 年間で最も多くなった。(図 4)。

2-2 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、2017 年は年間を通じてほとんどの月で検出され（GI.1, 2, 3, 6、GII.2, 3)、GI.1 と GI.2 が多く検出された（表 2)。

AsV については、2017 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)。AiV は、下水中から 2017 年 6 月までのほどんどの月で検出されてきたが、7 月以降検出頻度が少なくなった。

HAV については、2017 年は臨床サンプル、下水サンプルともに検出されなかった。

D. 考察

1. ふき取り調査

調理施設のふき取り調査では、NoV は検

出されなかった。聞き取り調査より、対象施設は、体調不良者もなく、トイレの清掃も行われており、衛生管理が良く行われている施設であった。また、調査期間には NoV の大きな流行がみられておらず、これらの要因により、検出されなかった可能性が考えられる。調査対象、期間の再考が必要である。

ふき取り検査出期間の検討では、1 ヶ月後のサンプルでも NoV 遺伝子が検出された。1 ヶ月以上前の汚染でも、ふき取り検査で陽性になる可能性があり、実際の事例において、ふき取り検査陽性の解釈に注意が必要と考えられる。

今回使用したキットは、3 時間程度と、従来の PEG 沈法と比較して短時間で結果が得られ、ふき取り調査法として有用な方法と考えられる。

2. 下水サーベイランス

NoV による感染性胃腸炎や食中毒が多く発生する 12 月～2 月に下水中の NoV 遺伝子量が増加し、臨床サンプルから検出される遺伝子型は、すべて下水サンプルからも検出された。これらのことより、下水中の NoV 遺伝子を調査することにより、NoV 流行を解析することができると考えられる。

下水中の NoV 遺伝子量のピーク値が大きいシーズンは、その後の非流行期と考えられる時期にも遺伝子量が多くなり、多くの感染者の存在が示唆された。流行のピーク時の感染者を減少させることが、全体としての感染者を減少させ、NoV 食中毒や感染症を減少させることにつながると考えられる。

下水中のウイルス遺伝子検出では、SaV、AsV、AiV など感染症発生動向調査などの統計上、顕在化しないウイルスについても広域的な感染状況は把握することができる。臨床と環境の両面からウイルス遺伝子を検出・解析することによって、下痢症ウイルスなどの腸管感染ウイルスの浸淫状況の全体像の把握ができると考える。これらの解析結果は、NoV 等のウイルス性食中毒や感染症の予防対策を考える上で、有用な情報を与えると考える。

E. 結論

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

下水流入水を用いて、下痢症ウイルス等の検出を行い、臨床サンプルから得られた結果と合わせて解析を行った。

これらの結果は、NoV 食中毒や感染症の予防に有用な情報を与える。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

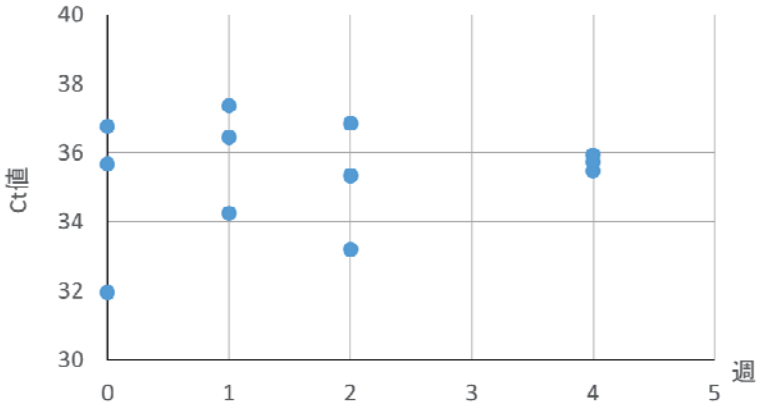


図 1 ふき取り検査における NoV 検出期間

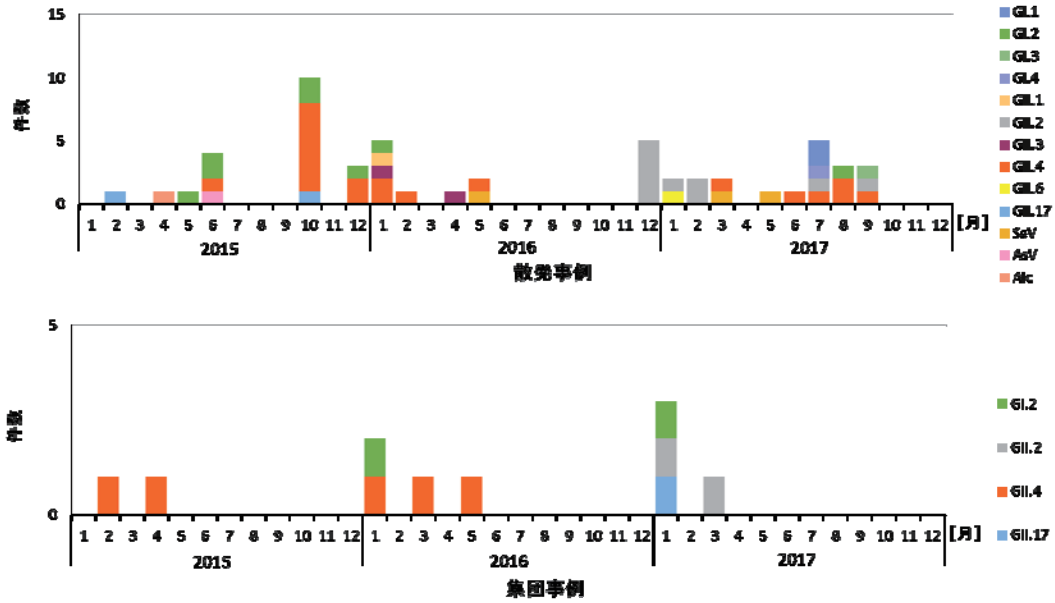
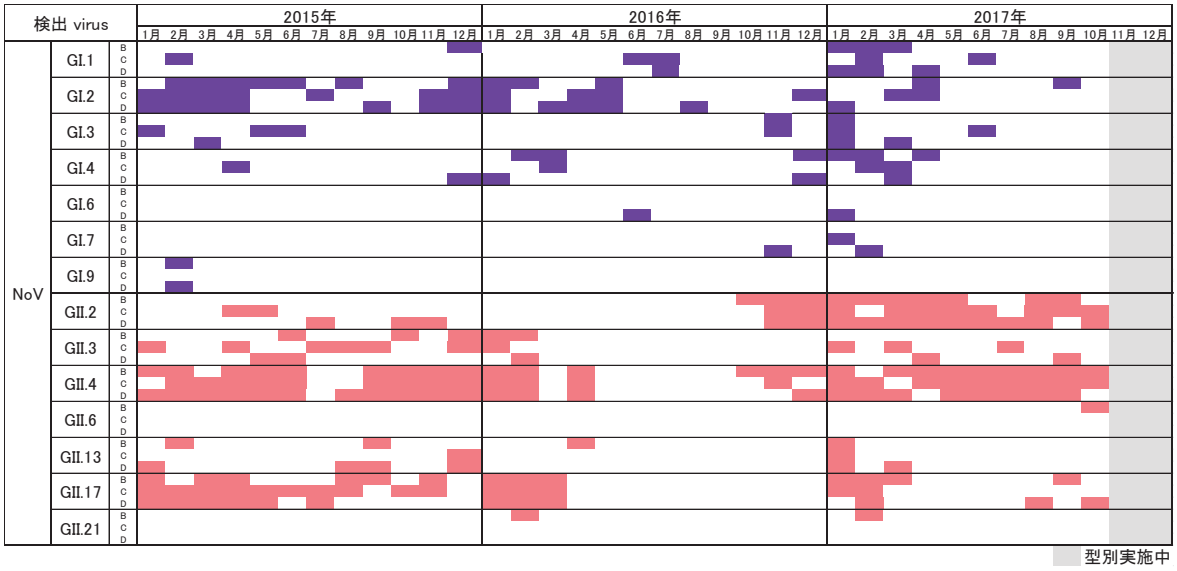


図 2 臨床検体からの下痢症ウイルス検出状況

表 1 下水中の NoV 検出状況（B～D 定点流入水）



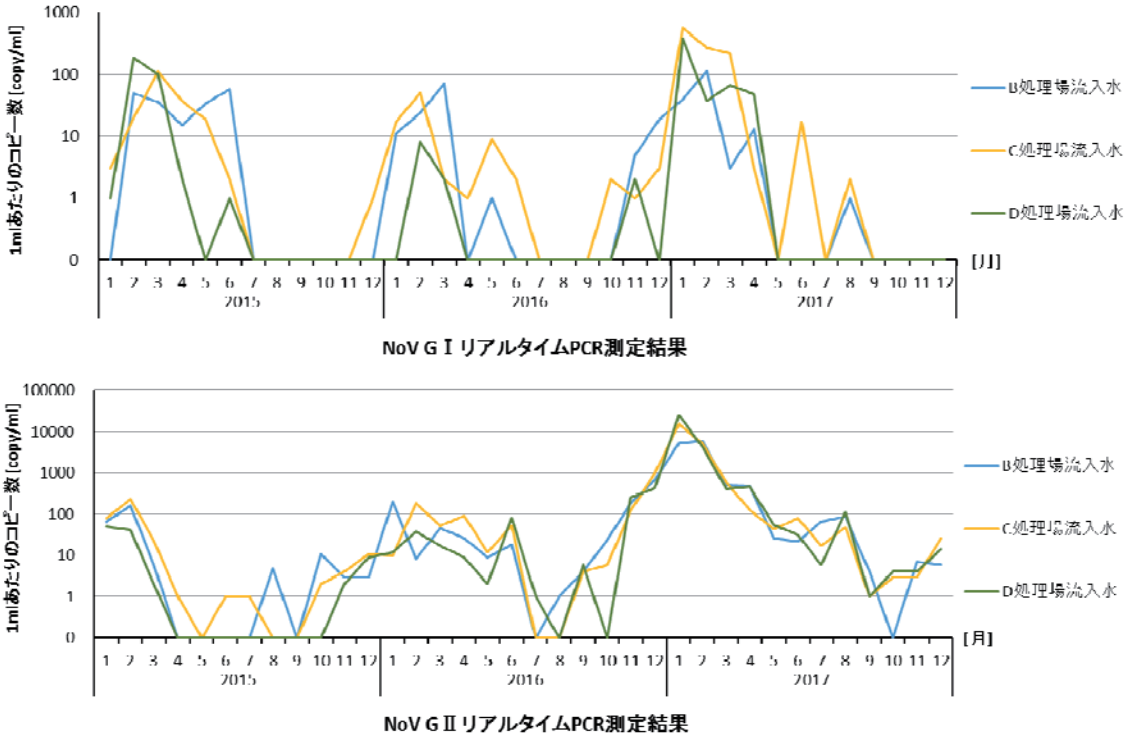


図 3 下水中の NoV 遺伝子定量結果

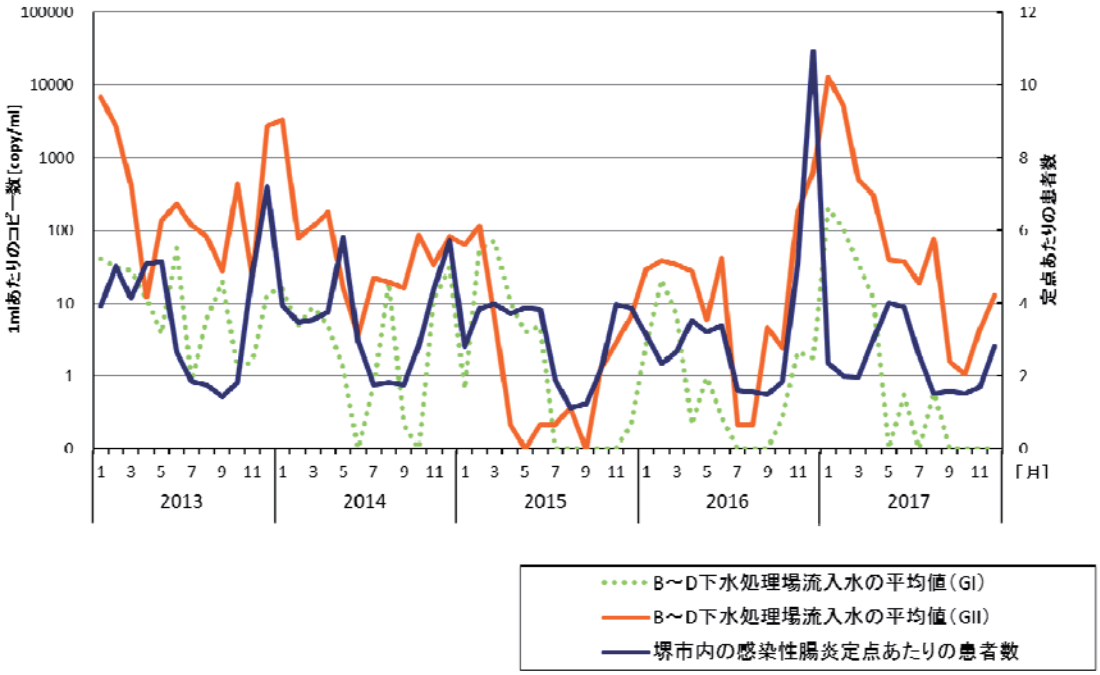
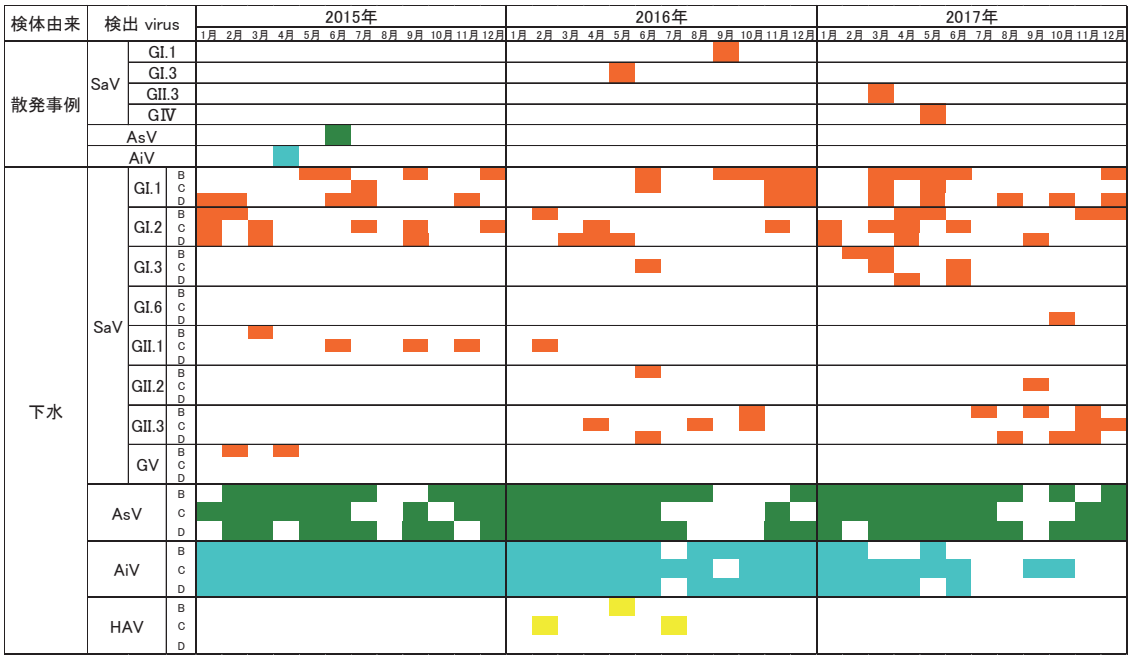


図 4 堺市内の感染性胃腸炎患者数と下水中の NoV

表 2 その他のウイルス検出状況



平成 29 年度厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)
「ウイルスを原因とする食品媒介性疾患の制御に関する研究」
研究協力報告

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

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

研究要旨

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

A.　研究目的

ウイルス性食中毒の検査では患者便、調理従事者便、原因と疑われる食品の検査に加え、調理施設からのウイルス検出も重要な検査事項である。しかしながら、調理施設のふき取り検体中におけるウイルス量は少量であることも多く、効率的な検出法が必要とされている。昨年度の報告書において、少量の界面活性剤（Zwittergent）入り PBS（－）でふき取り操作を行ったふき取り検体から、ウイルス濃縮行程を行わず、一定の回収率が得られる事を報告した。しかし、ふき取り液に加える Zwittergent は食品添加物に指定されておらず、食品取扱施設での使用には検査後のふき取り液の残存などに注意が必要である。そこで、代用品として食品添加物に指定されている界面活性剤の使用について検討を行った。また、検出感度の向上を目的に、核酸抽出キットについても抽出効率の比較検討を行った。

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

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

B. 研究方法

1. 界面活性剤の比較検討

供試材料には、ノロウイルス（遺伝子型 GII.17)陽性の 10%糞便乳剤を 10^1～10^3 倍に階段希釈した便乳剤を用いた。昨年度用いた Zwittergent の他に、Tween20(ポリソルベート)、シュガーエステル（ショ糖脂肪酸エステル）の 2 種類の界面活性剤について比較検討を行った（表１）。対照として、界面活性剤を加えない PBS(－)のみでのふき取りも行った。

方法（図 1）は、滅菌したステンレス製トレー上の 10 ㎝×10 ㎝の区画に希釈した便乳剤 140μl を滴下し、コーンラージ棒で塗布した後、60 分間自然乾燥させて模擬汚染環境とした。その後、各界面活性剤を含む PBS（－）で湿らせたふき取りキット(BM フキトレール A:GSI クレオス)で、縦 10 回、横 10 回、右斜め 5 回、左斜め 5 回のふき取り操作を 2 回繰り返した。次に、ふき取り棒に回収したウイルスを 0.7ml の各界面活性剤を加えた PBS（－）に再浮遊させ、その全量を回収して抽出試料とし、その内 280μl を用いて RNA 抽出を行なった。RNA 抽出には QIAamp Viral RNA mini Kit(キアゲン)を使用した。抽出 RNA は、PrimeScript RT reagent kit(タカラバイオ)と付属の Random Primer 6mer を用いて逆転写反応を行い、Kageyama ら（J. Clin. Microbiol. 2003）のプライマーおよびプローブを使用して、LC480 probes master(ロッシュ)で増幅し、ウイルスゲノム量を定量した。模擬汚染環境作製時に塗布した各希釈倍率の糞便乳剤についても核酸抽出および定量を行い、これを塗布量として、ふき取り検体の回収率を求めた。

2. 核酸抽出キットの比較

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

3. トイレ周辺におけるノロウイルスのモニタリング

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

ふき取り検体は採取後、図１の行程に従って処理を行い、cDNA 合成反応を行った後、Nested Real-time PCR 法により陽

性、陰性の判定を行った。その内、陽性検体については、Real-time PCR 法による定量と、Capsid N/S 領域の Nested PCR で得られた 2nd PCR 産物のダイレクトシークエ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 2.0（http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool）を用いて行った。なお、今回はノロウイルス GII のみを検査対照とした。

(倫理面への配慮)

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

C. 研究結果

1. 界面活性剤の比較検討

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

2. 核酸抽出キットの比較

核酸抽出キットの比較を表 3 に示した。①の 140μl 便乳剤中のノロウイルス定量値を各キットの抽出検体中に含まれているウイルス量とし、各キットの回収率を求めたところ、②の QIAamp Viral RNA mini Kit で 280μl のサンプルから抽出した場合は、回収率 86.4%-131.4%、③シカジーニアス DNA/RNA プレップキットは 77.0-115.8%、④innuPREP Virus RNA Kit は 10%未満となった。①、②及び③は同程度の回収率が得られることが判明した。また、検体中のウイルス量を 10^2 から 10^4 コピー/検体まで変えて検討を行っても、ウイルス量に関わらず回収率は常に同程度であった。

3. 公共施設トイレにおけるノロウイルスのモニタリング

今シーズン(2017/18 シーズン)の調査で、ノロウイルス GII が検出されたのは、1 検体のみで（表 4)、検出された遺伝子型は、今シーズン小児散発事例および集団感染症事例で多く検出されている GII.4 Sydney_2012 であった（表 5)。ふき取り検査で陽性となった場所は便座裏で、その定量値は 2.07×10^3 コピー/検体であった。

今シーズン及び昨シーズンに実施した、公共施設トイレふき取りによるノロウイルスモニタリング調査でのウイルス検出状況を、両シーズンの広島県における定点当りの感染性胃腸炎患者報告数のグラフに当てはめたところ（図 3)、昨シーズンは感染性胃腸炎の大きな流行があり、定点あたりの患者報告数の増加した時期にトイレのふき取りからノロウイルスが多く検出されたが、今シーズンは患者数が少なく、トイレのふき取りからの検出も非常に少なかった。

D. 考察

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

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

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

の流行状況を反映している事が改めて示唆された。

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

E. 結論

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

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

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

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

表１　使用した界面活性剤とその特徴

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

*ADI：1日摂取許容量

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

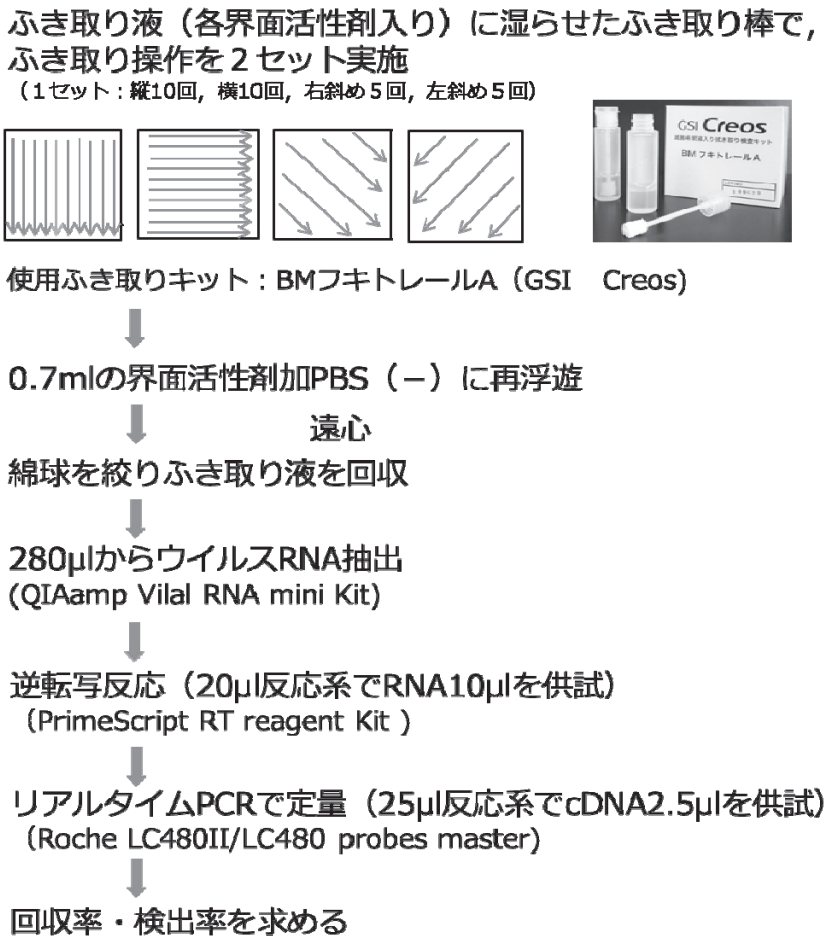


図１　ふき取りおよび検体処理の手順

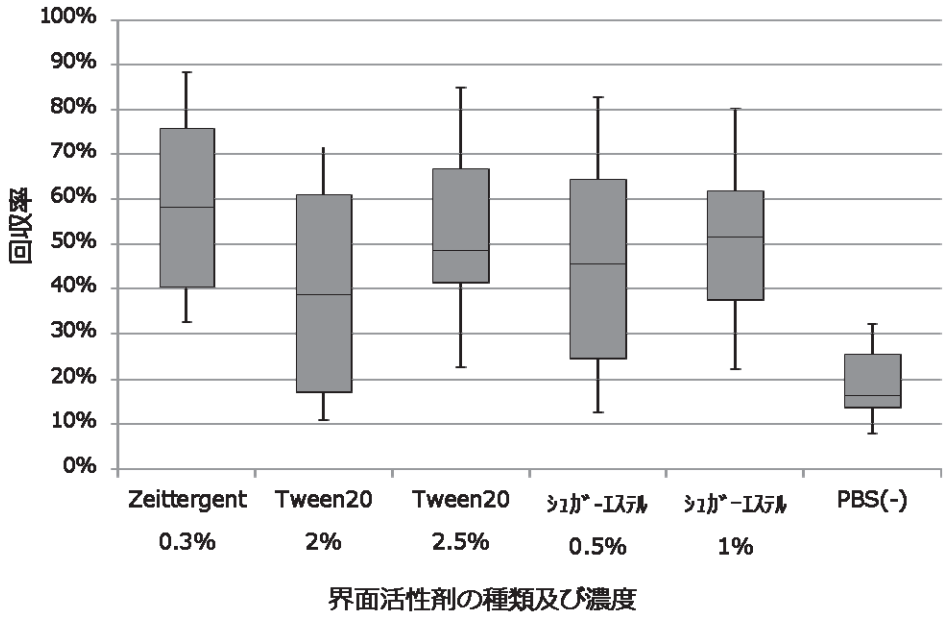


図2　界面活性剤の種類別回収率

表2　界面活性剤の比較

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

表3　核酸抽出キット別回収率

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

表4　ふき取り場所別NoV GII陽性数

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

表5　NoV GII陽性検体の検体採取日，ふき取り場所及び定量値

遺伝子型	検体採取日	ふき取り場所	定量値（ｺﾋﾟｰ/反応）
GII.4 Sydney_2012	Nov.26	便座裏	2.07×10^{3}

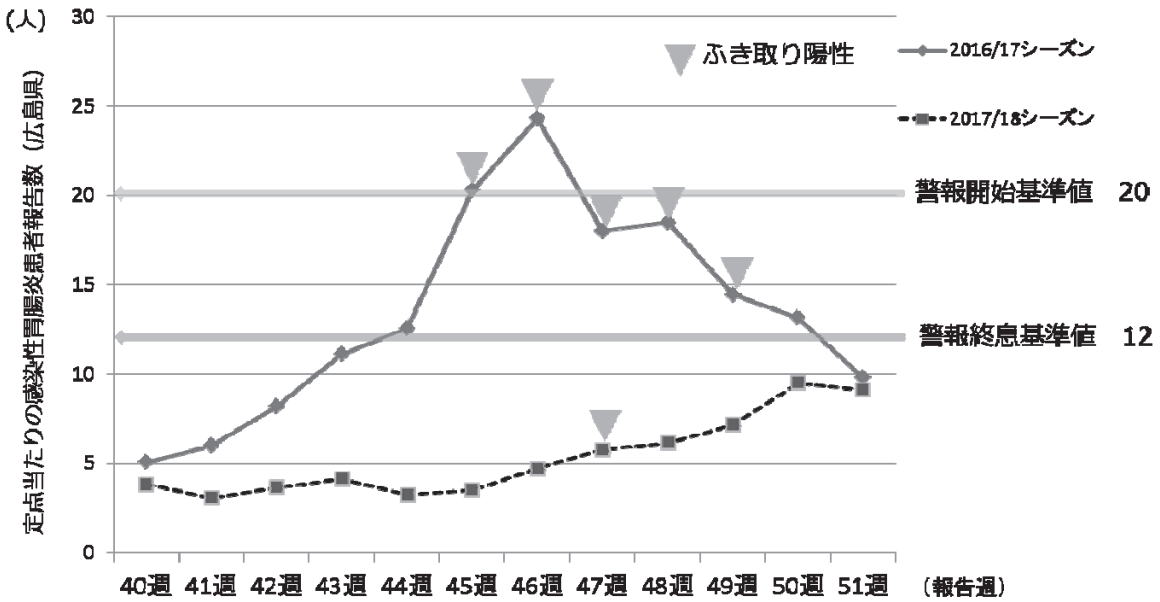


図3　定点当たりの感染性胃腸炎患者報告数（広島県）とふき取り検体からのノロウイルス検出状況

平成 29 年度厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)
「ウイルスを原因とする食品媒介性疾患の制御に関する研究」
研究協力報告

カキからのノロウイルス検出法の検討について

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	兼重　泰弘	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	松室　信宏	広島市衛生研究所

研究要旨

二枚貝中には遺伝子検査を阻害する物質等が存在し、ノロウイルス等の検出感度を低下させている可能性がある。カキからのノロウイルス添加回収試験を行うとともに、阻害物質の影響を軽減させるため、アセトンを添加する方法の検討及びアミラーゼ溶液の至適添加量の検討を行った。カキからのノロウイルス添加回収試験の結果、ポリエチレングリコールによる濃縮方法(PEG 沈殿法)でカキを濃縮した場合、回収率は約 1%であった。また、アセトン添加法において、中腸腺 1g に対し 250μl のアセトンを添加した場合に実測値コピー数が高い結果となった。アミラーゼ溶液の添加量により検出感度に違いはみられなかった。一方、PEG 沈殿法でカキを濃縮した場合は、中腸腺 1g に対し 10μl のアミラーゼ溶液を添加した場合に実測値コピー数が高かった。

A.　研究目的

二枚貝は、中腸腺にノロウイルス等のウイルスを蓄積する。ノロウイルスによる胃腸炎事例の中には、二枚貝を喫食したケースもあり、生食用カキの安全性確保や胃腸炎事例の原因究明のためには高感度なノロウイルスの検査が必要性である。

現在、二枚貝からのノロウイルス検査は、主に通知（平成 15 年 11 月 5 日付け食安監発第 1105001 号）による検査法で実施されている。通知法のリアルタイム PCR 法による定量的検出法の陽性判定基準は、実測値 10 コピー以上である。ノロウイルス胃腸炎を起こす二枚貝の中腸腺には、多くのノロウイルスが含まれていると推測されるが、陽性の判定基準である実測値 10 コピー以上となるケースは少ない。この原因の一つとして二枚貝中の遺伝子検査を阻害する物質等の影響が考

えられる。そこで、カキからのノロウイルスの検出感度を調べるため、カキへノロウイルスを添加し、回収試験を行った。また、阻害物質の影響を軽減させるため、昨年に引き続きアセトンを添加することによるカキからのノロウイルス検出法の改良及びアミラーゼ溶液の至適添加量を検討した。

B. 研究方法

1. カキからの PEG 沈殿法によるノロウイルス添加回収試験

ノロウイルス陰性のカキ中腸腺 1g に、ノロウイルス GⅡ陽性便乳剤 20μl を添加し、PBS(-)9ml を加え 10 倍乳剤とした。PEG 沈殿法で濃縮し、1ml の DDW で再浮遊させた。対照として、ノロウイルス GⅡ陽性便乳剤 20μl を 1ml の DDW に溶解させたものを使用した。これらを RNA 抽出材料とした。QIAamp Viral RNA Mini Kit(QIAGEN)で RNA を抽出し、Reverse Transcription Kit(ライフテクノロジーズジャパン)及び Oligo(dT)Primer(ライフテクノロジーズジャパン)で逆転写反応を行った。ノロウイルスの検出はリアルタイム PCR 法(primer : COG2F/ALPF,COG2R、probe:RINGAL-TP-N4)で行い、それぞれ 2 ウェルの実測値コピー数を比較した。

2. アセトン添加法の改良についての検討

ノロウイルス陰性のカキ中腸腺 1g に、ノロウイルス GⅡ陽性便乳剤 20μl 及び PBS(-)を表 1 のとおり添加し、アミラーゼ 125 mgを添加し、37℃、1hr インキュベートした。アセトンを表１のとおり添加し、10 秒間ボルテックスを行い、3,000rpm、4℃、5min 遠心した上清 250μl を微量遠心チューブに回収し、さらに 12,000rpm、5min 遠心し、上清を RNA 抽出材料とした。対照として、「１．カキからの PEG 沈殿法によるノロウイルス添加回収試験」と同様に、ノロウイルス GⅡ陽性便乳剤 20μl を 1ml の DDW に溶解させたものを使用した。RNA 抽出以降は同様に検査を行った。

3. アミラーゼ至適添加量の検討

ノロウイルス陽性カキ中腸腺 1g に、アセトン添加法の改良についての検討により至適濃度であると確認できたアセトン 250μl を添加する方法でアミラーゼ至適添加量の検討を行った。PBS(-)750μl を添加し、アミラーゼ溶液をそれぞれ 0、10、50、100、200μl 添加し、37℃、1hr インキュベートを行った。「2. アセトン添加法の改良についての検討」と同様にアセトン 250μl を添加し、比較検討を行った。さらに、PEG 沈殿法でも同様に実施し、アセトン添加法と PEG 沈殿法でのアミラーゼ溶液の効果について比較した。アミラーゼ(和光純薬)溶液は、50ml の遠心管に 5g のα-アミラーゼ粉末、PBS(-)20ml を添加・混合し、8,000g、4℃、20min 遠心した。上清を別の遠心管に採取し、孔径 0.22μl の滅菌フィルターでろ過し、ろ液と等量のグリセリンを添加し、-20℃で保存しているものを使用した。

(倫理面への配慮)

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

C. 研究結果

1. カキからの PEG 沈殿法によるノロウイルス添加回収試験

ノロウイルス GⅡ陽性便乳剤を添加したカキからのリアルタイム PCR の 2 ウエルの実測値コピー数は 0.38 コピー/5μl と不検出（平均は 0.19 コピー/5μl）であった。一方、対照として実施した検体のリアルタイム PCR の実測値コピー数は 21.48 コピー/5μl と 26.90 コピー/5μ l（平均 24.19 コピー/5μl）であった。カキ中腸腺にノロウイルスを添加した場合は、対照として行った DDW にノロウイルスを添加した場合の 0.79%の回収率であり、約 100 分の 1 以下の検出感度であった。

2. アセトン添加法の改良についての検討(図 1)

昨年はアセトンと PBS(-)を等量添加した結果を報告した。今年度は、アセトンの添加割合を変えて至適アセトン濃度を検討した。同一色が同一ロットのカキの結果を示した。コピー数が少なく回収率にばらつきが生じているが、アセトン添加割合 10～30%で回収率が高くなった。特に中腸腺 1g に 250μl のアセトンを添加した場合に、最も良好な結果であった。

3. アミラーゼ至適量の検討

1) アセトン添加法による検討(図 2)

「2. アセトン添加法の改良についての検討」における結果から、添加割合として最適であった中腸腺 1g に 250μl のアセトンを添加し、アミラーゼ溶液の至適添加量を検討した。中腸腺 1g に対し 10～100μl のアミラーゼ溶液を添加した場合には、ほとんど違いはみられなかったが、200μl 添加した場合には、若干コピー数が低い結果となった。

2) PEG 沈殿法による検討(図 3)

同様に PEG 沈殿法でのアミラーゼ溶液の至適量を検討した。PEG 沈殿法では中腸腺 1g あたり 10μl を添加した場合に最も検出コピー数が高く、50μl 及び 100μ l を添加した場合は 10μl 添加した場合の約半分程度の実測値コピー数であった。0μl 及び 200μl を添加した場合は、ほとんど検出されなかった。

アセトン添加法と PEG 沈殿法によるアミラーゼ溶液の検討結果を同じグラフ上にプロットした(図 4)。中腸腺 1g に対し、アミラーゼ溶液を 10μl 添加した場合は、両法とも同等程度の回収率であったが、アミラーゼ溶液を添加しない場合や、過剰なアミラーゼ溶液を添加した場合は、アセトン添加法の実測値コピー数が高い結果となった。

D. 考察

カキからの PEG 沈殿法によるノロウイルス添加回収試験により、カキからのノロウイルスの検出は、検査の過程で約 100 分の 1 程度検出感度が低下していることが考えられた。しかし、実際のカキでは中腸腺にノロウイルスが取り込まれている状況であるため、さらに検出されにくいことが推測される。このように、カキには遺伝子検査を阻害する物質が含まれているため、それらの阻害物質の影響を減らす必要がある。今回、アセトン添加法の改良とアミラーゼ溶液の至適添加量の検討を行った。アセトン添加法では、中腸腺 1g に対し 250μl を添加した場合

に最も高い実測値コピー数が得られた。

アミラーゼ溶液の至適添加量の検討結果から、アセトン添加法では、アミラーゼ溶液の添加により実測値コピー数に変化がないことが考えられた。PEG 沈殿法では、中腸腺 1g あたり 10μl を添加した場合が最も実測値コピー数が高い結果となった。PEG 沈殿法では、添加しない場合や、200μl など多い量のアミラーゼ溶液を添加した場合は、実測値コピー数が低い結果となった。しかし、アセトン至適濃度、アミラーゼ至適量で検査を行っても、若干の検出感度が良くなる程度にとどまった。今後も引き続き検査法の検討を行う必要があると思われる。

E. 結論

今年度は、昨年度に引き続きアセトン添加法によるカキからのノロウイルス検出法の改良と、アミラーゼ溶液の至適量の検討を行った。アセトン添加法では、中腸腺 1g に対し 250μl のアセトンを添加することで実測値コピー数が若干高い結果となったが、アミラーゼ溶液添加量による検出感度に違いはみられなかった。一方、PEG 沈殿法では、アミラーゼ溶液を中腸腺 1g あたり 10μl 添加した場合に実測値コピー数が高いことが示唆された。

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：なし

表 1 PBS(-)及びアセトン添加量

PBS(-)	0	950	900	800	750	700	600	500	400	250
アセトン	0	50	100	200	250	300	400	500	600	750

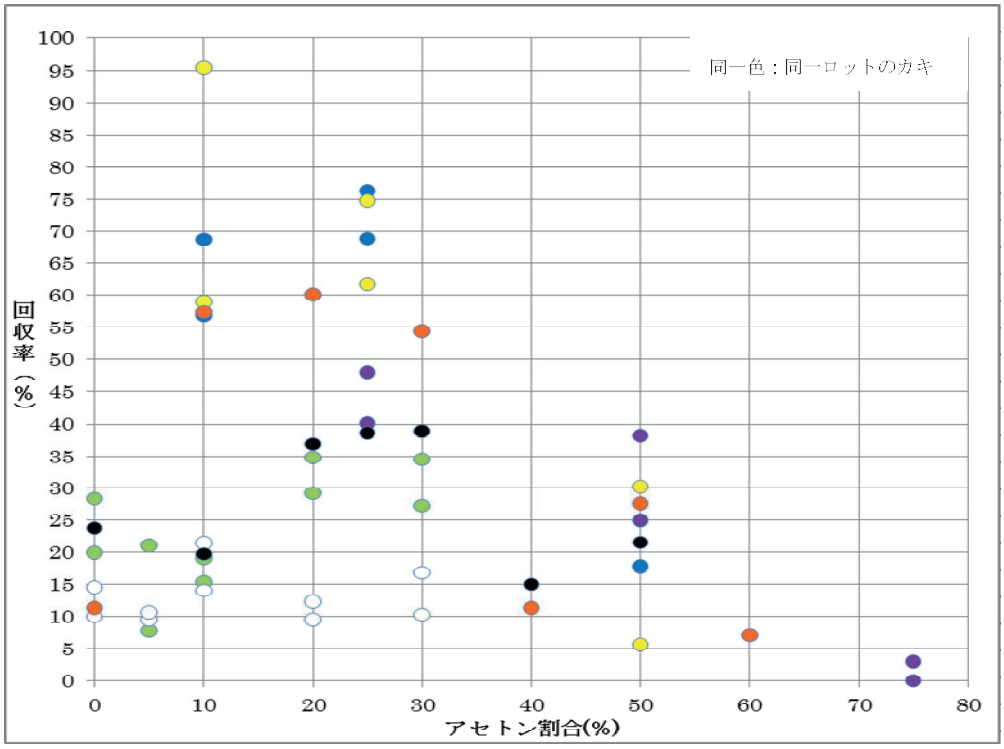


図１　アセトン添加割合によるノロウイルス回収率

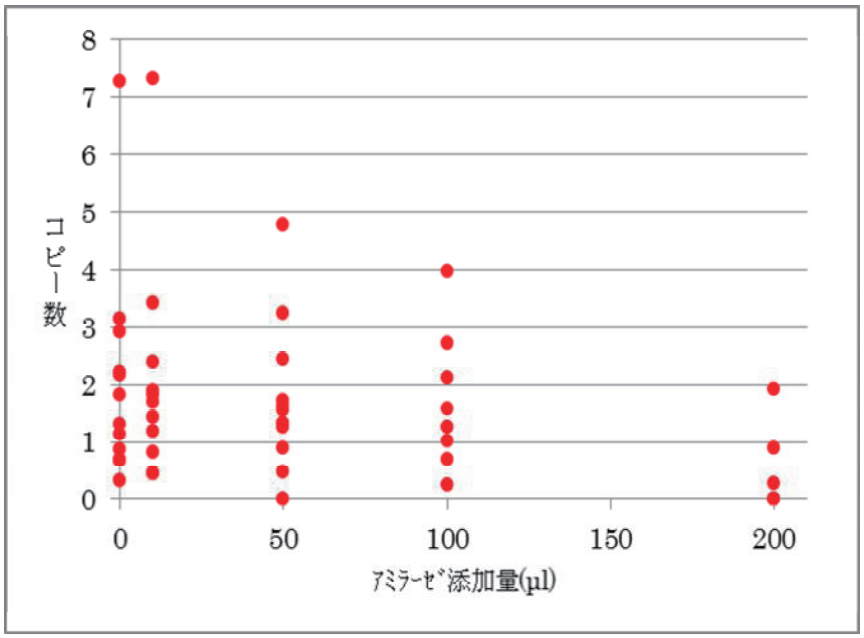


図２　アミラーゼ添加量によるノロウイルス検出コピー数(25%アセトン)

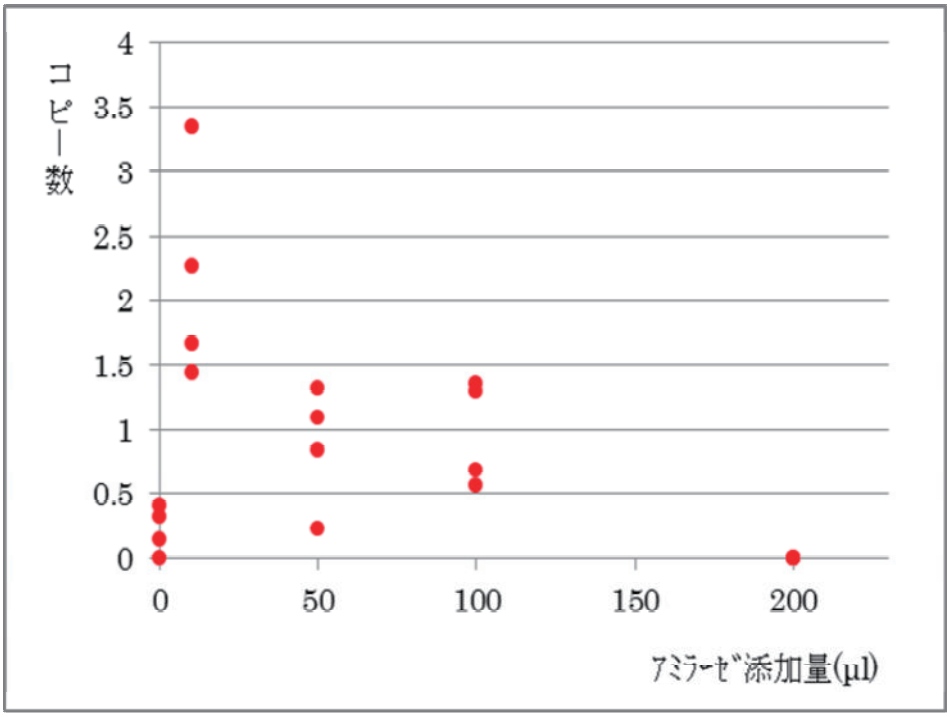


図３　アミラーゼ添加量によるノロウイルス検出コピー数(PEG 沈殿法)

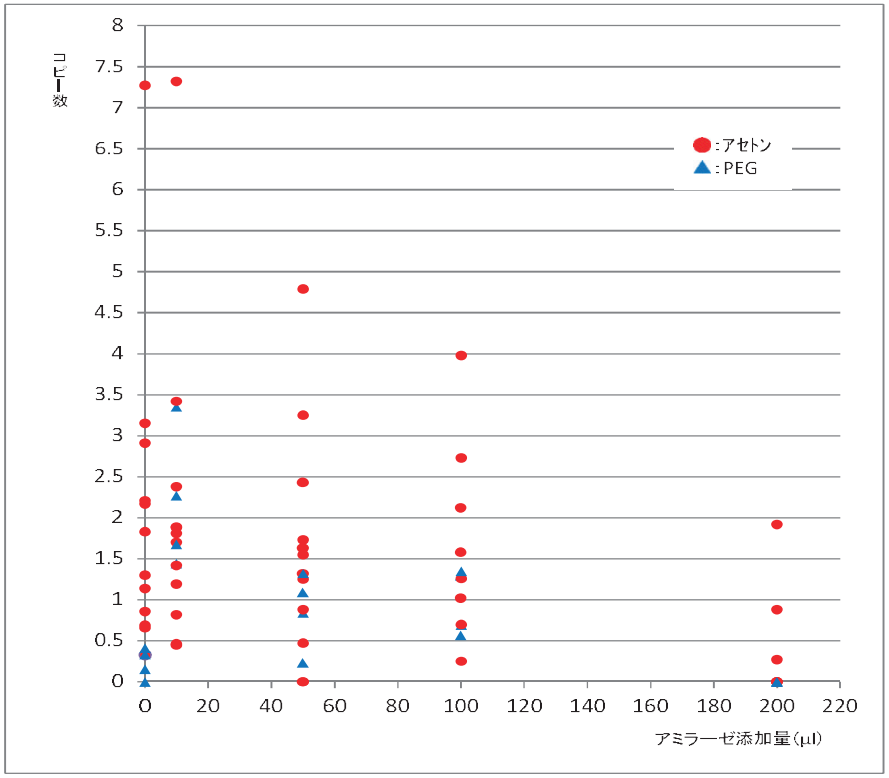


図４　アセトン添加法と PEG 沈殿法の検出コピー数の比較

平成 29 年度厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)
「ウイルスを原因とする食品媒介性疾患の制御に関する研究」
研究協力報告

流入水中ノロウイルスの定量および抗ノロウイルス活性のある化合物の探索

研究協力者	小林　孝行	福岡県保健環境研究所
研究協力者	吉冨　秀亮	福岡県保健環境研究所
研究協力者	中村　麻子	福岡県保健環境研究所
研究協力者	芦塚　由紀	福岡県保健環境研究所
研究協力者	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）の流行状況を把握するため、環境検体である終末処理場流入水からの NoV 検出を行った。2016/17 シーズンは、2016 年 11 月から NoVGII の検出値が増加し始め、2017 年 1 月にピークを示した。また、感染性胃腸炎の報告数は 2016 年 12 月にピークを示し、両者の動態に関連が認められた。

抗ノロウイルス活性を持つ化合物の探索を目的に、ネコカリシウイルス（FCV）及びマウスノロウイルス（MNV）を用いたスクリーニング系を導入し、化合物の評価を行った。評価を行った 120 化合物のうち、14 化合物において FCV または MNV に対する抗ウイルス活性が認められた。

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主要な原因ウイルスとして知られている。NoV の生活環の一つとして、感染者の腸管で増殖したウイルスが便とともにトイレに排出された後、下水から海水に至り、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。そこで本研究では、終末処理場流入水からの NoV 検出状況や感染性胃腸炎の発生状況の解析を行った。

また、NoV による食中毒の予防には手指や調理器具の洗浄、あるいは糞便や嘔吐物によって汚染された環境の消毒が重要である。NoV を不活化させるには次亜塩素酸ナトリウムが推奨されているが、人体への影響から手指等への使用が難しく、より安全かつ効果の高い消毒剤が望まれている。NoV は培養が困難であることから、

NoV に対する薬剤の不活化評価を行うには培養可能な NoV 代替ウイルスが使用されている。薬剤に対する感受性はウイルスの種類等により異なることから複数

種の代替ウイルスを使用することが推奨されている。そこで、NoV 代替ウイルスであるネコカリシウイルス（FCV）及びマウスノロウイルス（MNV）を用いたスクリーニング系により、抗ノロウイルス活性を有する化合物の探索を行った。

今回、感染性胃腸炎の発生状況と終末処理場流入水の NoV 量との関連性を解析すること、並びに NoV の消毒剤や治療薬として寄与する化合物を探索することで感染予防対策に資することを目的に研究を行った。

B. 研究方法

1. 材料

終末処理場流入水は 2016 年 11 月から 2017 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。

抗ノロウイルス活性を評価する化合物として、天然生理活性物質ライブラリー（Sigma-Aldrich）を購入し、120 化合物について評価を行った。NoV 代替ウイルスとして FCV-F9 株および MNV を使用し、それらのウイルスを接種する細胞として CRFK 細胞および RAW264.7 細胞をそれぞれ用いた。

2. 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。即ち、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. 抗ノロウイルス活性の評価方法

NoV 代替ウイルスを用いた化合物の評価は Ohba らの方法（J.Antibiotics,70,443-447,2017.）に基づいて行った。即ち、評価を行う化合物を 100μM、10μM、1μM および 0.1μM の 4 段階に細胞培地を用いて希釈し、100TCID50/50μl に調整した FCV または MNV と等量混合（化合物の反応溶液の終濃度はそれぞれ半分となる）し、37℃、5%CO_2 条件下で 30 分間静置した。CRFK 細胞または RAW264.7 細胞を播種した 96 穴プレートに混合液を 120μl/well ずつ接種し、同条件下で 1 時間培養した。培養後、PBS(-)で洗浄し、5%FBS 加 EMEM(CRFK 細胞)または 5%FBS 加 DMEM（RAW264.7 細胞）を 150μl/well ずつ加えて培養・観察を行った。抗ウイルス活性の評価は細胞変性効果（CPE）の有無により判断した。即ち、化合物非処理のウイルス液を入れたウェルを用意し、そのウェルに CPE が現れた段階で全てのウェルを確認し、CPE が現れなかった化合物を抗ウイルス活性あり、CPE が現れたものを抗ウイ

ルス活性なしと判断した。

(倫理面への配慮)

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

C. 研究結果

1. 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)。NoVGIは2017年5月のB終末処理場からの検体でのみ検出され、検出値は9.0×10^4 コピー/Lであった。また、NoV GIIは2017年1月に最も多く検出され、検出値は9.6×10^7 コピー/Lであった。

2. 抗ノロウイルス活性の評価

天然生理活性物質120化合物について抗ウイルス活性を評価した結果、14化合物がFCVまたはMNVに対する抗ウイルス活性を示した(表1)。このうち11化合物(Myricetin、beta-Carotene、Scutellarein、Gallic acid、Diosmetin、Ferulic acid、Ginkgolide B、Shikonin、(+/-)-Gossypol、(-)-Epicatechin、Caffeine)がFCVに対して、3化合物(Melatonin、Cytisine、Asiatic acid)がMNVに対して抗ウイルス活性を示した。FCVに効果を示した化合物は全て100μMの希釈濃度で効果を示し、MNVに効果を示した化合物は、2化合物(Melatonin、Asiatic acid)が100μM、1化合物(Cytisine)が10μMの希釈濃度で効果を示した。FCVおよびMNV両方に効果を示す化合物は無かった。

D. 考察

2016/2017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2016年11月ごろから増加し始め、2016年12月(第51週)に一峰性のピークとなった。この12月におけるピークは流入水中のNoV検出を開始した2013年1月からの調査期間中で最大の値(17.97)であった。また、今回の流入水調査においてもNoV量は2016年11月ごろから増加し始め、2017年1月に一峰性のピークを示し、特にB終末処理場におけるNoV GIIの定量値は過去の調査期間中における最大値(9.6×10^7 コピー/L)を示した。よって、2016年12月における感染性胃腸炎報告数の増加が2017年1月における流入水中のNoV量の増加に反映されたものと考えられる。このことから感染性胃腸炎の報告数と流入水中のNoV量には関連があり、流入水調査をすることで県内のNoV流行状況を把握することができることが示唆された。終末処理場別にみると、両者のNoV GIIの定量値は概ね同じ動態を示したことから、県内におけるNoVの流行状況に地域性はなかったものと考えられる。

天然生理活性物質120化合物について抗ノロウイルス活性の評価を行ったところ、14化合物が抗ウイルス活性を示した。抗ノロウイルス活性を持つ化合物は種々の報告があり、柿抽出物や紅茶に含まれるテアフラビン類などのポリフェノール類が知られている。今回効果を示したMyricetin、Scutellarein、Diosmetin、(-)-Epicatechinはテアフラビン類と同じくフラボノイドの骨格を有するポリフェノールの一種である。既報の化合物と構造が類似していることから本研究のスクリーニングにより見出されたと推察さ

れた。その他の化合物は植物から単離される化合物であるが、類似の化合物の報告はなく、作用機序が不明であるため今後詳細な解析が必要である。本研究ではFCV およびMNV を使用したが、両者に効果を示す化合物は見つからなかった。今後も化合物のスクリーニングを継続し、抗ノロウイルス活性物質としての活用が期待される物質の探索を行う必要がある。

以上のことから、今後も流入水中のNoVの動態に注視すること、並びに抗ノロウイルス活性物質の検証を進めることでNoV 感染防止につなげていくことが重要である。

E. 結論

・2016/17 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。

・FCV およびMNV を用いたスクリーニング系により天然生理活性物質 120 化合物について抗ノロウイルス活性を評価したところ、14 化合物がFCV またはMNV に対する抗ウイルス活性を示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

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

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

3) 小林孝行, 吉冨秀亮, 中村麻子, 芦塚由紀, 梶原淳睦, 野田衛：福岡県内で発生したノロウイルスGⅠ.Pc-GⅠ.5による食中毒事例について, 第 43 回九州衛生環境技術協議会, 北九州市, 10 月 12 日, 2017

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

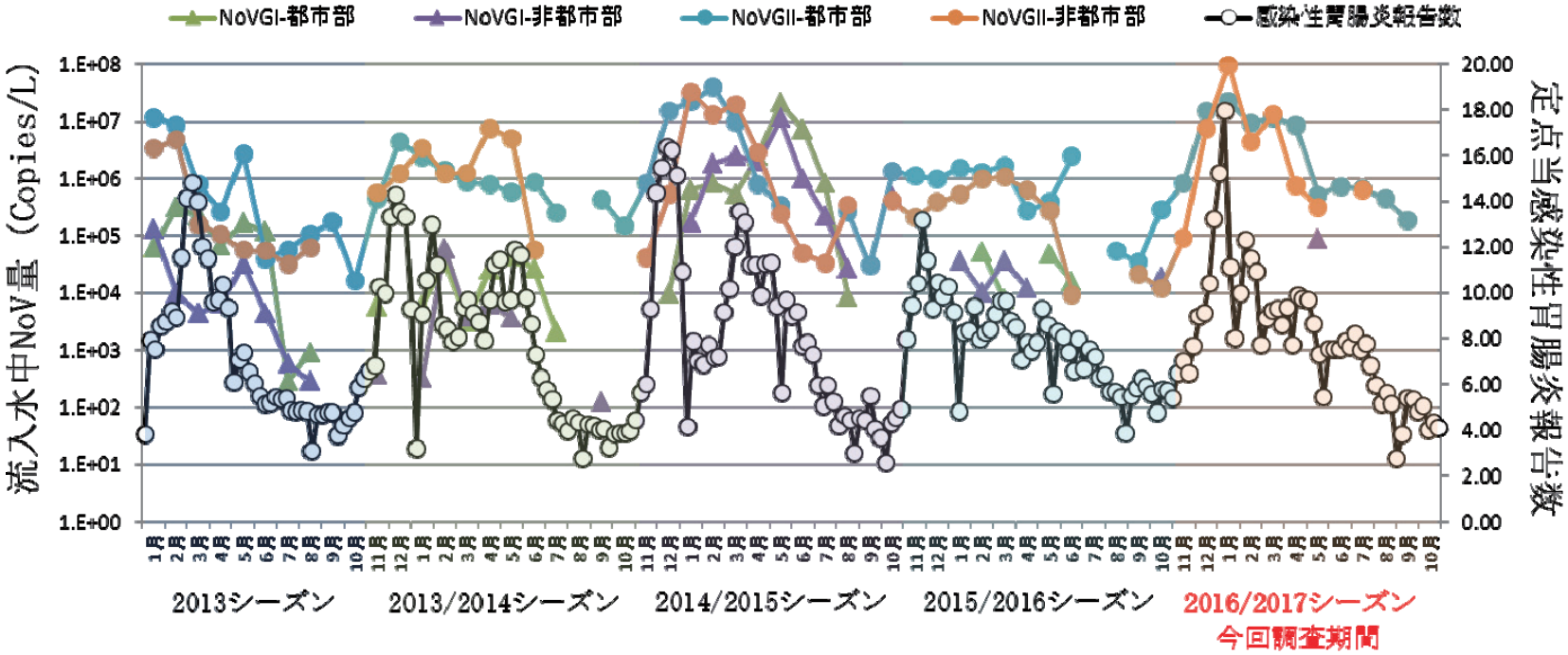


図１　流入水からの NoV 遺伝子検出状況と感染性胃腸炎報告数

表１　天然生理活性物質ライブラリーの抗ノロウイルス活性スクリーニング結果

10	:効果濃度 10μM	100	:効果濃度 100μM	－	:効果なし

No.	CHEM_NAME	Effective Concentration(μM)		No.	CHEM_NAME	Effective Concentration(μM)	
		FCV	MNV			FCV	MNV
1	Myricetin	100	－	61	Tanshinone IIA	－	－
2	beta-Carotene	100	－	62	Indole-3-carbinol	－	－
3	Scutellarein	100	－	63	Rosmarinic acid	－	－
4	Gallic acid	100	－	64	Silibinin	－	－
5	Diosmetin	100	－	65	Osthole	－	－
6	Ferulic acid	100	－	66	Naringenin	－	－
7	Ginkgolide B	100	－	67	Hesperidin	－	－
8	Shikonin	100	－	68	Phloretin	－	－
9	(+/-)-Gossypol	100	－	69	Cryptotanshinone	－	－
10	(-)-Epicatechin	100	－	70	Baicalein	－	－
11	Caffeine	100	－	71	Caffeic acid	－	－
12	Melatonin	－	100	72	Theobromine	－	－
13	Cytisine	－	10	73	Emodin	－	－
14	Asiatic acid	－	100	74	Retinol	－	－
15	Magnolol	－	－	75	Ellagic acid	－	－
16	OROXYLIN A	－	－	76	Chrysin	－	－
17	Fucoxanthin	－	－	77	Betulinic acid	－	－
18	NOBILETIN	－	－	78	Canthaxanthin	－	－
19	alpha-Mangostin	－	－	79	Neohesperidin dihydrochalcone	－	－
20	(-)-Gallocatechin gallate	－	－	80	2-(4-Hydroxyphenyl)ethanol	－	－
21	Arbutin	－	－	81	Oxymatrine	－	－
22	Pelargonidin chloride	－	－	82	APIGENIN	－	－
23	Physcion	－	－	83	Aucubin	－	－
24	Galangin	－	－	84	Chlorogenic acid	－	－
25	(-)-Epicatechin gallate	－	－	85	L-Rhamnose monohydrate	－	－
26	Maslinic acid	－	－	86	Puerarin	－	－
27	Daunorubicin hydrochloride	－	－	87	Indole-3-butyric acid	－	－
28	p-Coumaric Acid	－	－	88	Taxifolin	－	－
29	Berberine Chloride	－	－	89	Palmatine chloride hydrate	－	－
30	Nordihydroguaiaretic acid	－	－	90	4-Methylumbelliferone	－	－
31	Matrine	－	－	91	Rutaecarpine	－	－
32	(-)-Bilobalide	－	－	92	naringin dihydrochalcone	－	－
33	ACACETIN	－	－	93	Xanthone	－	－
34	3,3'-Diindolylmethane	－	－	94	Sinomenine	－	－
35	Resveratrol	－	－	95	Fisetin	－	－
36	Luteolin	－	－	96	Hematoxylin	－	－
37	Daidzein	－	－	97	QUERCETIN DIHYDRATE	－	－
38	Forskolin	－	－	98	Kinetin	－	－
39	(+/-)-Octopamine hydrochloride	－	－	99	Sclareol	－	－
40	3-Hydroxytyrosol	－	－	100	Nalidixic acid	－	－
41	Parthenolide	－	－	101	Vanillylacetone	－	－
42	Evodiamine	－	－	102	Rhein	－	－
43	(-)-Epigallocatechin	－	－	103	Orotic acid	－	－
44	Genistein	－	－	104	Biochanin A	－	－
45	Retinoic acid	－	－	105	Stigmasterol	－	－
46	Echinacoside	－	－	106	(1H-INDOL-3-YLMETHYL)-DIMETHYL-AMINE	－	－
47	Yohimbine hydrochloride	－	－	107	BERGENIN MONOHYDRATE	－	－
48	Plumbagin	－	－	108	Colchicine	－	－
49	Rutin trihydrate	－	－	109	L-Carnitine hydrochloride	－	－
50	Oleanolic acid	－	－	110	18beta-Glycyrrhetinic acid	－	－
51	Ursolic acid	－	－	111	Formononetin	－	－
52	Citrinin	－	－	112	Shikimic acid	－	－
53	(+/-)-Catechin hydrate	－	－	113	Hyodeoxycholic acid	－	－
54	Diosmin	－	－	114	Neohesperidin	－	－
55	Curcumin	－	－	115	Cinchonidine	－	－
56	(-)-Arctigenin	－	－	116	Hordenine	－	－
57	NARINGIN	－	－	117	CHRYSOPHANIC ACID	－	－
58	(+/-)-Taxifolin hydrate	－	－	118	Dihydroartemisinin	－	－
59	Honokiol	－	－	119	Baicalin	－	－
60	Tanshinone I	－	－	120	Piperine	－	－

*赤枠内は FCV または MNV に抗ウイルス活性を示した 14 化合物

研究成果の刊行に関する一覧表

1. 論文発表

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

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

Imamura S, Kanezashi H, Goshima T, Haruna M, Okada T, Inagaki N, Uema M, Noda M, Akimoto K. (2017)Next-Generation Sequencing Analysis of the Diversity of Human Noroviruses in Japanese Oysters., Foodborne Pathog Dis., Jun 8. doi: 10.1089/fpd.2017.2289.

Imamura S, Kanezashi H, Goshima T, Suto A, Ueki Y, Sugawara N, Ito H, Zou B, Uema M, Noda M, Akimoto K. (2017)Effect of High-Pressure Processing on Human Noroviruses in Laboratory-Contaminated Oysters by Bio-Accumulation., Foodborne Pathog Dis., Jun 8. doi: 10.1089/fpd.2017.2294.

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

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

上間　匡, 野田　衛 (2017)ノロウイルスによる食中毒, 公衆衛生, 81(6)

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

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

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

野田　衛 (2017)本邦初の刻み海苔を介した分散型広域ノロウイルス食中毒事件の全体像, 食品衛生研究, 67.7-14

2. 学会発表

Hiroyuki Saito, Yuko Shimizu, Hiroko Sato, Wakako Akino, Satoshi Hayakawa and Hiroshi Usijima : Immunological response in a patient of noroviruses infection associated with raw oyster. 第65回日本ウイルス学会学術集会, 2017, 大阪

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

今村彩貴, 金指大海, 五島朋子, 須藤篤史, 植木　洋, 菅原直子, 伊藤　博, 鄒　碧珍, 上間　匡, 野田　衛, 秋元京子 (2017)高圧処理によるノロウイルス人為汚染カキの汚染低減効果, 第38回日本食品微生物学会学術総会, 徳島市, 10/5

今村彩貴, 金指大海, 五島朋子, 須藤篤史, 植木　洋, 菅原直子, 伊藤　博, 鄒　碧珍, 上間　匡, 野田　衛, 秋元京子 (2017)高圧処理による養殖カキ中のノロウイルス汚染低減効果, 第113回日本食品衛生学会学術講演会, 江東区, 11/9

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

斎藤博之, 秋野和華子, 佐藤寛子, 清水優子, 早川　智, 牛島廣治, 野田　衛 (2017)ノロウイルス GII.17 に対するパンソルビントラップ・トラップ法の有効性に関する検討, 第113回日本食品衛生学会学術講演会, 江東区, 11/9

斎藤博之, 秋野和華子, 佐藤寛子, 清水優子, 早川智, 牛島廣治, 野田衛 : ノロウイルス GII.17 に対するパンソルビン・トラップ法の有効性に関する検討, 第113回日本食品衛生学会学術

講演会，2017，東京
斎藤博之，秋野和華子，佐藤寛子，清水優子，早川智，牛島廣治，野田衛：パンソルビン・トラップ法の捕捉抗体供給源としてのガンマグロブリンの再評価，第 38 回日本食品微生物学会学術総会，2017，徳島

斎藤博之，秋野和華子，佐藤寛子，清水優子，早川智，牛島廣治，野田衛：生カキが原因でノロウイルスに感染した症例におけるノロウイルス排泄状況と抗体価の推移，第 29 回秋田応用生命科学研究会講演会，2017，秋田

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

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

小林孝行，吉冨秀亮，中村麻子，芦塚由紀，梶原淳睦，野田衛：福岡県内で発生したノロウイルスＧⅠ.Pc-GⅠ.5 による食中毒事例について，第 43 回九州衛生環境技術協議会，北九州市，10 月 12 日，2017

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

小林孝行，吉富秀亮，中村麻子，芦塚由紀，梶原淳睦，野田　衛（2017）福岡県内の食中毒事例から検出されたノロウイルス GI.Pc-GI.5 の遺伝子解析，第 38 回日本食品衛生学会学術総会，徳島市，10/5

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

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

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

入谷展弘，上林大起，改田　厚，阿部仁一郎，山元誠司，久保英幸，野田　衛：2016/17 シーズンに大阪市で認められたノロウイルス GII.2 流行， 第 65 回日本ウイルス学会， 大阪（2017.10.24-26）

髙木弘隆，永田文宏，上間匡，野田衛（2017)食品媒介性及び介在性ウイルスに関する不活性化評価手法の策定に向けた検討(1)－ヒトノロウイルス代替ウイルス選定に関する検討，第 38 回日本食品微生物学会学術総会，徳島市，10/5