

食材、食中毒関連情報の収集、地方衛生研究所における検証

研究分担者

愛媛県立衛生環境研究所 四宮博人

研究協力者

北海道立衛生研究所 吉澄志磨

宮城県保健環境センター 坂上亜希恵、植木 洋

埼玉県衛生研究所 岸本 剛

東京都健康安全研究センター 貞升健志

大阪健康安全基盤研究所 白井達哉、西嶋駿弥、左近直美

山口県環境保健センター 岡本玲子、調 恒明

福岡県保健環境研究所 田中義人

愛媛県立衛生環境研究所 豊嶋千俊、中西千尋、岩城洋己、山下育孝、青木紀子

研究要旨

食中毒原因ウイルスの食品からの検出や同定は、食品を汚染しているウイルス量が少ないことや食品に含まれる夾雑物が検出を妨げることなどから困難な場合が多い。そのため原因食品や汚染経路の特定に至らず、効果的な対策を取るための知見も不足している。高感度検出系の開発により、原因ウイルスの食品等への汚染経路の解明がすすめば、今後の予防対策に貢献できると考えられる。今回、我々は、ノロウイルス食中毒の主要な原因食品であるカキの中腸腺抽出液に段階希釈したノロウイルス懸濁液を添加する実験系を構築し、その試料中のウイルスをリアルタイム PCR およびデジタル PCR によって定量した結果、逆転写反応からデジタル PCR までを **One-Step** で行う方法が最も検出感度が高いことが判明した。デジタル PCR ではサンプルを標的遺伝子コピー1個または全く含まない多数の個別の PCR に分割するため、増幅後にコピー数の総数が算出され、標準物質を必要とせず、またサンプルを多数のサブサンプルに分割することで、食品中の夾雑物成分に由来する酵素阻害物質の影響を低減できる可能性がある。これらの結果は、食中毒原因ウイルスの高感度検出系の開発、延いては同ウイルスの感染制御に向け、有益な方法論を提供するものと期待される。

A. 研究目的

食中毒の原因となるウイルスは、ノロウイルス、サポウイルス、ロタウイルス、レオウイルス、アイチウイルス、A型・E型肝炎ウイルス、アデノ

ウイルス等、多くのウイルスが知られている。これらによる食中毒は、事件数にして全体の2割、患者数にして全体の5割を占める。

ヒト検体から同定されたウイルスの遺伝子情報

報は、地方衛生研究所（以下、地衛研）と国立感染症研究所（以下、感染研）の連携により蓄積されているものの、食中毒の原因と疑われる食品からのウイルスの検出や同定は、食品を汚染しているウイルス量が少ない事や、食品に含まれる夾雑物が検出を妨げる事などから困難な場合が多い。そのため原因食品や汚染経路の特定に至らず、効果的な対策を取るための知見も不足している。

食品からのウイルス検出において、デジタルPCR(dPCR)法による高感度検出法は有望な方法の候補である。リアルタイムPCR(qPCR)法による定量には、ノロウイルス等の標準物質が不可欠であるが、dPCRではサンプルを標的遺伝子コピー1個または全く含まない数千個の個々のPCRに分割するため、増幅後にコピー数の総数が算出され、標準物質を必要としない。また、サンプルを多数のサブサンプルに分割することで、食品のマトリックタイプの成分等に由来する酵素阻害物質の影響を低減できる可能性がある。

今回、当分担任は、昨年度ノロウイルス遺伝子を含むプラスミドを用いて試行したdPCRによる高感度検出を実際の検体を用いて検討した。検体としては、ノロウイルス食中毒の主要な原因食品であるカキを用いた。

B. 研究方法

1. 検体：食品検体としてカキを用い、ノロウイルス検査の常法にしたがって、カキ中腸腺の抽出液を調製した（以下、中腸線抽出液）。ノロウイルスとして患者由来糞便懸濁液（qPCRによりコピー数を概算済み）をもちいた（以下、ノロウイルス懸濁液）。

2. RNA抽出と逆転写反応：食品検体としての中腸線抽出液に変量のコピー数を含むノロウイルス懸濁液を加え、QIACube（QIAGEN社）またはmagLEAD 12gC（Precision System Science社）を用いてRNAを抽出した。常法にしたがい、RNA抽出液をDNase処理後、逆転写(RT)反応

を行った。

3. 遺伝子増幅法：RT産物中のノロウイルスcDNAをqPCR（7900HT Fast, Applied Biosystems社）またはdPCRの一種であるdroplet dPCR(ddPCR)（QX200 ddPCRシステム、BIO-RAD社）により増幅して検出した。qPCRは3ウェル測定し、平均値を得た。ddPCRでは、RT産物の増幅以外に、RNA抽出液からOne-Stepで逆転写反応からddPCRを行う方法も実施した。

倫理面への配慮

本研究課題は、研究代表者及び研究分担者を研究者として、国立感染症研究所倫理審査委員会で審査され、承認された。また、当分担者を研究代表者、協力地衛研担当者を研究協力者として、愛媛県立衛生環境研究所倫理審査委員会で審査され、承認された。ヒト由来検体の検体情報について、これらの倫理審査に基づき、適切に取り扱った。

C. 研究結果

ノロウイルス食中毒の主要な原因食品であるカキの抽出液を用い、そこへ段階希釈したノロウイルス懸濁液を添加する実験系を構築した。中腸線抽出液中に変量のノロウイルスを添加した試料からRNAを抽出し、RT反応後、qPCRおよびddPCRによって検出した。RNA抽出液からOne-StepでRT反応からddPCRを行う測定系も実施した。それぞれの測定値からRNA抽出液中のターゲット配列のコピー数結果を表1に示す。RNAの抽出方法（QIACube, magLEAD 200, 400）によらず、ddPCRがqPCRよりも検出感度が高かった。ddPCR測定系中では、RNA抽出液からのOne-Step反応系が最も検出感度が高い結果であった。

D. 考察

糞便等のヒト由来検体の検査に比べ、ウイルス

量が少ない食材・食品や汚染水に対する検査方法は十分に確立しておらず、これらの検体からの食中毒原因ウイルスの高感度検出方法の開発が望まれている。

通常の PCR は、最終増幅産物をアガロースゲル電気泳動で検出するエンドポイント解析であり、定量性がなく、qPCR では、蛍光を用いた検出により反応進行中の増幅産物を測定することができるものの、陽性コントロールによる標準曲線に対して正規化する必要があり、増幅効率のばらつきが結果に影響を与える可能性もある。一方、dPCR では、PCR 増幅と蛍光プローブによる検出方法を基礎としながら、標準曲線を用いることなくサンプル中のターゲット DNA コピー数を高感度に絶対定量することが可能である。さらに、dPCR の一種である droplet dPCR (ddPCR) では、サンプル DNA は 20,000 個の液滴に分割された後、それぞれの液滴で独立して PCR 増幅が行われ、陽性と陰性の液滴の数をポアソン統計解析することで、正確な絶対定量が可能である。

今回、ノロウイルス食中毒の主要な原因食品であるカキを用い、その中腸腺抽出液に段階希釈したノロウイルス懸濁液を添加する実験系を構築した。その試料から実際の検査で行われる操作によってウイルス RNA を抽出し、qPCR および

ddPCR によって検出・定量を行った。これまでに得られた結果では、ddPCR 法、特に RT 反応から ddPCR まで One-Step で行う方法が最も検出感度が高かった。今後さらなる検討を要するが、食品、拭き取り検体、環境水などからの食中毒原因ウイルスの高感度検出方法が確立すれば、各種ウイルスの汚染経路や感染パターンの解明に繋がり、今後の予防対策に貢献できると期待される。

E. 結論

ノロウイルス食中毒の主要な原因食品であるカキの中腸腺抽出液に段階希釈したノロウイルス懸濁液を添加する実験系を構築し、その試料中のウイルスを qPCR および ddPCR によって定量した結果、ddPCR 法、特に RT 反応から ddPCR まで One-Step で行う方法が最も検出感度が高いことを明らかにした。これらの結果は、今後の食中毒原因ウイルスの感染制御に向け、有益な方法論を提供するものと期待される。

G. 研究発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

該当なし

表1. カキ中腸腺抽出液中ノロウイルスのリアルタイム PCR またはデジタル PCR による検出

検体番号	中腸腺抽出液への ノロウイルス添加 コピー数	qPCR 測定による RNA 抽出液中コピー数	ddPCR 測定による RNA 抽出液中コピー 数	One-Step ddPCR 測 定による RNA 抽出液 中コピー数
QIAcube (中腸腺抽出液 130 μ L + ノロウイルス懸濁液 10 μ L)				
Q-1	None	N. D.	N. D.	N. D.
Q-2	1. 16E+02	N. D.	N. D.	N. D.
Q-3	1. 16E+03	N. D.	60	204
Q-4	1. 16E+04	36	270	654
Q-5	1. 16E+05	507	2, 250	8, 220
Q-6	1. 16E+06	3, 313	11, 700	75, 900
magLEAD 200 (中腸腺抽出液 190 μ L + ノロウイルス懸濁液 10 μ L)				
M1-1	None	N. D.	N. D.	N. D.
M1-2	1. 16E+02	N. D.	N. D.	50
M1-3	1. 16E+03	N. D.	N. D.	75
M1-4	1. 16E+04	7	200	365
M1-5	1. 16E+05	79	700	2, 600
M1-6	1. 16E+06	1, 444	12, 750	39, 600
magLEAD 400 (中腸腺抽出液 380 μ L + ノロウイルス懸濁液 20 μ L)				
M2-1	None	N. D.	N. D.	N. D.
M2-2	3. 32E+02	N. D.	N. D.	50
M2-3	3. 32E+03	N. D.	N. D.	40
M2-4	3. 32E+04	N. D.	175	700
M2-5	3. 32E+05	2. 2	1, 275	5, 050
M2-6	3. 32E+06	2. 6	10, 250	71, 000

qPCR : real-time PCR, ddPCR : droplet digital PCR