研究成果報告書（研究要旨）

研究課題名	食品のウイルス汚染のリスク評価のための遺伝子検査法の開発と応用に関する研究（課題番号：1203）（研究期間：平成２４年度～平成２５年度）
主任研究者名	研究者名：野田　衛 所属機関：国立医薬品食品衛生研究所

ノロウイルス(NoV)、A型肝炎ウイルス(HAV)及びE型肝炎ウイルス(HEV)などの食品媒介ウイルスの多くは培養が不可能か困難であることから、その検出は主に遺伝子検査で行われている。遺伝子検査では感染性のないウイルス粒子に由来する遺伝子が検出される欠点があり、食品におけるウイルスのリスク評価を行う上で大きな支障となっている。

そこで本研究では、食品等の検体から感染性ウイルスを選択的に検出するための遺伝子検査法の開発を試みた。開発した方法は、RNaseによる露出ウイルスRNAの消化及びオリゴdTプライマーによる逆転写反応を行った後、リアルタイムPCR法で遺伝子の定量的検出を行うものである。

開発法を評価するために、加熱、紫外線照射あるいは次亜塩素酸ナトリウム処理で不活化させたNoV及びネコカリシウイルス（FCV）を用いて、開発法及び従来法による遺伝子定量並びにFCV感染価測定を行った。その結果、いずれの不活化においても、開発法の遺伝子定量値は感染価を完全には反映しなかったが、従来法と比較して感染価をより反映した。同様の結果は、有機物不含または含有条件における、乾燥状態あるいは液体中での実験室内生存性試験あるいは海水中での野外生存性試験においても得られた。また、それらの生存性試験により、NoVは有機物が多い環境で生存性が高くなることや、海水中では夏期より冬期の生存性が高いことなどが明らかになった。

開発法を下水やカキからのNoV検出に応用した結果、流入水と比較して放流水の中に不活化したNoVがより多く含まれていることや、カキには不活化したNoVが蓄積していることが示された。また、NoVとFCVの生存性は特に下水放流水や海水において異なることも明らかになった。

一方、抗体被覆ウイルス粒子は非感染性である可能性があることから、抗体被覆ウイルス粒子と抗体非被覆ウイルス粒子の簡便な分別回収法の開発が必要である。

そこで我々は、プロテインAカラムあるいはパンソルビン®を用いた2種類の分別回収法を開発した。両法は、IgG抗体被覆粒子と非被覆粒子の鑑別、またそれらに抗ヒトIgA抗体を添加することにより、IgAまたはIgG抗体被覆粒子と非被覆粒子の鑑別を行うものである。

両法を患者糞便中のNoV検出に適応した結果、IgA被覆粒子が多いと糞便中のウイルス量が少なくなる傾向があること、小児より大人で抗体被覆粒子が多く存在することなどが明らかになった。HAV及びHEVの加熱不活化実験を行い、それらの不活化条件に関するデータを蓄積した。また、HEV抗原検出ELISA法を確立した。

以上の結果から、我々が開発した方法は、食品、下水、海水、環境の拭き取りあるいは臨床材料から感染性ウイルスを検出するのに有用な方法であると考えられた。また、本法

で得られたデータは食品中のウイルスのリスク評価に大きく寄与するものと思われる。

研究成果報告書（本体）

研究課題名	食品のウイルス汚染のリスク評価のための遺伝子検査法の開発と応用に関する研究（研究期間：平成２４年度～平成２５年度）
主任研究者名	所属：国立医薬品食品衛生研究所 氏名：野田　衛（研究課題番号：１２０３）

Ⅰ　研究の期間及び研究目標等

１　研究期間

平成 24 年度～平成 25 年度

２　研究目的

食品媒介性ウイルスとして重要なウイルスはノロウイルス,A 型および E 型肝炎ウイルスである。ノロウイルスによる食中毒は食中毒患者の半数を占め，その対策が最も急がれる食品媒介性ウイルスである。A 型肝炎ウイルスは主に二枚貝や水等に媒介され，我が国では 2010 年春季に患者数が急増し，死亡例も見られた。E 型肝炎ウイルスはイノシシやシカの肉等の喫食により感染し，劇症化のリスクが高い。これらの食品媒介性ウイルスに関しては，リスクプロファイルが作成され，その被害実態等の整理が進んでいる。一方，これらのウイルスは組織培養や小動物での増殖が不可能か困難（長時間かかる）なため，食品や環境からの検出は遺伝子検査で行われている。しかし，遺伝子検査は必ずしも感染性ウイルスを検出している訳ではなく，このことが，用量反応など食品媒介性ウイルスのリスク評価を困難にしている最大かつ共通の理由となっている。

近年，遺伝子検査に先立ち，検体を RNA 分解酵素処理，蛋白分解酵素と RNA 分解酵素の併用処理あるいはエチジウム・モノアミド/光照射処理等を行うことにより，感染性ウイルスと非感染性ウイルスとを区別する遺伝子検査法が幾つか報告されている。しかしながら，これらの方法のうちどの方法が優れているのか，また，どの程度，感染性ウイルス量を反映しているのか不明な点が多い。これらの方法で測定される結果が，現在行われている遺伝子検査の結果と大きく乖離していた場合，現在の検査法による種々のデータは食品の汚染リスクを過大評価していることになり，今後より正確に汚染リスクを反映するデータを得ることができる検査法に変更する必要性も生じてくる。これらのことから，食品のウイルス汚染の正確なリスク評価には，感染性ウイルスの選択的検出法を確立することが極めて重要である。

本研究では，食品のウイルス汚染の正確なリスク評価に必要なデータを得ることを目的として，これらの新たに開発された検査法の評価を行い，どの方法が最も感染性ウイルス推定定量法として優れているかを検証し，必要に応じて検査法の改良・開発を試みる。また，ネコカリシウイルス，A 型および E 型肝炎ウイルスなど培養可能なウイルスを用いて，種々の物理化学的な不活化処理を行い，感染性ウイルス量と本法における定量値の比較を行う。さらに，実際の食品や環境からのノロウイルス検出に適用し，現行の検査法の結果と比較する。最終的には，感染性ウイルス量を選択的に検出する次世代の

標準的遺伝子検査法の確立を目指す。これにより上記ウイルスの用量反応を正確に捉えることが可能となり，リスク評価が正確に行えるようになる。具体的には，以下の効果が期待できる。

① 国内の市販カキの約 10%からノロウイルスが，また，市販豚肉の約 0.2%から E 型肝炎ウイルスが検出されているが，これらの感染性のリスクは不明である。食品汚染調査に本検査法を導入することにより，食品のより正確なリスク評価が可能になる。

② ノロウイルスは症状消失後，長期間便中へ排出されるが，その感染性の有無は不明である。これらの検査に本法を適応することにより，調理従事者等の感染リスクを正確に把握することができる。

③ 下水や海水中の感染性ウイルス量も不明である。特に，下水の塩素処理後の感染性ウイルス量と遺伝子定量値との関連性も未知である。本法を適応することにより，下水の感染性ウイルスの除去効率をより正確に把握することが可能になる。また，床等の環境から検出されるノロウイルスの感染リスクの把握も可能になる。

3 研究体制

研究項目名	個別課題名	担当者
遺伝子検査法の評価・開発	感染性推定遺伝子検査法の横断的比較，評価および開発	上間 匡(国立医薬品食品衛生研究所)
	感染性推定遺伝子検査法の有用性の評価	上間 匡(国立医薬品食品衛生研究所) [研究協力者] 青沼えり (明治薬科大学)
感染性推定遺伝子検査によるウイルス生存性試験と汚染調査への応用	感染性推定遺伝子検査法によるウイルスの生存性試験	野田 衛(国立医薬品食品衛生研究所) [研究協力者] 三元昌美(国立医薬品食品衛生研究所) 高橋 肇，木村 凡(東京海洋大学) 栗原慶隆，照山晏菜 (明治薬科大学)
	感染性推定遺伝子検査法の食品等の汚染実態調査への応用	野田 衛(国立医薬品食品衛生研究所) [研究協力者] 重本直樹，久常有里(広島県立総合技術研究所・保健環境センター) 入谷展弘，山元誠司，改田 厚，阿部仁一郎，久保英幸(大阪市立環境科学研究所) 内野清子，三好龍也，岡山文香，芝田有理，田中智之(堺市衛生研究所) 吉冨秀亮，吉山千春，世良暢之(福岡県保健

		環境研究所) 溝口嘉範，磯田美穂子，木田浩司，濱野雅子，藤井理津志(岡山県環境保健センター) 佐藤直人，森田晴美，高橋雅輝 齋藤幸一(岩手県環境保健研究センター) 森　功次，宗村佳子，林　志直(東京都健康安全研究センター) 山下育孝，青木里美(愛媛県立衛生環境研究所) 小林慎一(愛知県衛生研究所)
A 型肝炎ウイルスの生存性，不活化条件に関する研究	A 型肝炎ウイルスの生存性，不活化条件に関する研究	石井　孝司(国立感染症研究所) [研究協力者] 塩田智之(国立感染症研究所)
E 型肝炎ウイルスの生存性，不活化に関する研究	E 型肝炎ウイルス 抗原検出系の樹立	李　天成(国立感染症研究所)
	E 型肝炎ウイルスの熱安定性の検討	李　天成(国立感染症研究所)

研究協力者が複数の個別課題に関与した場合は，主に関与した個別課題に記入した。

4　倫理面への配慮について

本研究にあたっては，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する。また提供試料，個人情報を厳格に管理，保存する。そのデータについて個人が特定されないよう，特段の配慮をする。必要に応じて，各研究実施機関の医学研究倫理審査委員会に申請し，インフォームドコンセントに係る手続きを実施する。データの取り扱いに関して行政機関の承諾が必要な場合は，事前に協議を行い，施設が特定されないように，配慮する。取り扱うすべての遺伝子および病原性微生物に関しては適切な封じ込めレベルの実験施設で取り扱われる。各種研究材料の取り扱い及び組換え DNA 実験は，適切な申請を行い，承認を受ける。

5　当初計画からの変更点

A 型肝炎ウイルスおよび E 型肝炎ウイルスの不活化条件については，平成 24 年度中間評価において「ノロウイルスに絞ることを条件に継続」，「A・E 型肝炎ウイルスの研究よりノロウイルスのテーマにしぼって，成果をしっかりまとめるべき」との評価意見があったことから，平成 25 年度の研究は中止した。A 型肝炎ウイルスおよび E 型肝炎ウイルスの不活化条件に予定していた予算については，「最終年度は，二枚貝の汚染実態の調査，食中毒原因食品の調査の充実に期待」との中間評価意見を受け，食品等の汚染実態調査に充当し，対象地域，検体数を増やして研究を行った。

Ⅱ　研究内容及び成果等

1　研究項目名：遺伝子検査法の評価，開発(研究担当者：上間　匡，所属機関名：国立医薬品食品衛生研究所)

1)　個別課題名：感染性推定遺伝子検査法の横断的比較，評価および開発

感染性推定遺伝子検査法として，RNase 処理，RNase 処理と proteinaseK 処理の併用（2 法），エチジウムモノアザイド(EMA)処理の計 4 法および前処理を行わない従来法の計 5 種類の方法について，加熱処理，紫外線処理および塩素処理を行ったネコカリシウイルスおよびノロウイルス GII/4 の遺伝子の定量値の変化をリアルタイム PCR 法で定量するとともに，ネコカリシウイルスについては 50%感染終末点法で感染価を測定し，有用性を横断的に検証した。すなわち，ノロウイルスおよびネコカリシウイルスを用いて，一般的な不活化法である加熱処理，紫外線照射処理および次亜塩素酸ナトリウム処理における遺伝子定量値の減少等を指標として実施した。すなわち，ノロウイルス GII.4(3.4×10^6/50μl in 0.5%Alb-MEM(0.5%牛血清アルブミンを含む MEM 培地))及びネコカリシウイルス(3.4×10^6/50μl in 0.5%Alb-MEM)を加熱処理(75℃で 0 分，2 分，10 分，30 分間加熱)，紫外線照射処理(約 3,200μW/cm2 の紫外線を 0 分，1 分，4 分，15 分照射)あるいは次亜塩素酸ナトリウム処理(最終濃度 0ppm，50ppm，100ppm，250ppm の濃度になるようにそれぞれ 2 倍濃度の次亜塩素酸ナトリウム液を等量加え，10 分間作用)を行った後(図 1)，各検査法に従い処理した(図 2)。各処理液から RNA を抽出後，逆転写反応により cDNA を合成し，リアルタイム PCR 法で遺伝子量を定量した(図 3)。リアルタイム PCR 法については，ノロウイルスは厚生労働省の通知法に基づき，ネコカリシウイルスは遺伝子の 3’末端付近(7487-7609)に設定した当所開発の方法で実施した。

上記の横断的評価試験の検討結果から，優れていると判断された方法を基本として，遺伝子損傷をより高感度に検出するための改良，高感度化のための改良，検査結果のバラつきの要因をおさえるための改良等を行った。

内部コントロールとしてネコカリシウイルスを添加するための，条件設定を行った。

また，抗体被覆ウイルス粒子鑑別法として，ELISA 法，プロテイン A カラム処理法，パンソルビン処理法について，実用化に向けての検討を行った。

2)　個別課題名：感染性推定遺伝子検査法の有用性の評価

開発した感染性推定遺伝子検査法について，加熱処理，紫外線処理，塩素処理，各種異なる環境での生存性試験等により，遺伝子定量値および培養可能なネコカリシウイルス等の感染価の動態を比較することにより，開発法の有用性を評価した。

抗体被覆ウイルス粒子鑑別法については，小児感染性胃腸炎患者または食中毒事例の患者，従事者から採取された糞便を用いて，その有用性を検証した。

2　研究項目名：感染性推定遺伝子検査によるウイルス生存性試験と汚染調査への応用(研究担当者：野田　衛，所属機関名：国立医薬品食品衛生研究所)

1)　個別課題：感染性推定遺伝子検査法によるウイルスの生存性試験

ネコカリシウイルス等の培養可能なウイルスおよびノロウイルスを用いて，下記の項目について生存性試験を行い，ウイルスの培養による感染価測定と感染性推定遺伝子検査法によるウイルス RNA の定量試験を調べた。

(1)　乾燥状態での生存性試験

ノロウイルスは患者が室内環境で嘔吐した場合，嘔吐物に含まれるノロウイルス粒子が感染源となり，集団発生に至る場合が多い。特に，嘔吐物の処理が不十分で，カーペット等に残存したウイルスが乾燥して，空気中に浮遊し，感染源になることも指摘されている。そのため，乾燥した状態で存在するウイルスがどの程度感染価を保持するかを調べることが重要である。

本研究では室内環境に残存し，乾燥したウイルスがどの程度感染性を保持するかを推定するために，ステンレスバットにウイルスを塗布後，乾燥させた後，経日的に感染価等の推移を測定して，乾燥状態でのウイルスの生存性を調べる。

風乾あるいは自然乾燥により乾燥したウイルス（ネコカリシウイルスおよびノロウイルス GII）について最大約 180 日にわたり，感染価および遺伝子定量値の動向を調べた。

2 種類(0.5%アルブミン加 MEM 培地(0.5%Alb-MEM)およびノロウイルス陰性の糞便から MEM 培地で 10%乳剤を作製後，遠心した上清(10%糞便上清 in MEM))の希釈液にノロウイルスおよびネコカリシウイルスの各保存液を添加したもの 50μl を 24 穴マイクロプレートの各ウエルに接種後，接種液をウエルの底全面に拡げた。その後実験室内に室温で放置した。翌日ウイルス液はまだ完全には乾燥していなかったので，安全キャビネット内でファンによる吸引環境での風乾を約 3 時間行い，ウイルス液を乾燥させた。2 回目はほぼ完全に自然乾燥するまで放置した。乾燥後，マイクロプレートに蓋をして実験室内に室温で放置した。乾燥させた日を 1 日目として，最大 181 日目まで放置した。10%ビーフエクストラクト加 MEM250μl を加え，4℃，15 分間放置した後，ピペッティングでウイルス液を回収した。回収日ごとに，0.5%Alb-MEM または 10%糞便遠心上清 in MEM で希釈液したウイルス液について各 2 ウエルからウイルス液を回収し，1 つは遺伝子定量，他方はネコカリシウイルスの感染価測定用として，供試時まで-80℃で保存した。

(2)　水溶液中での生存性試験

水溶液中でのウイルスの生存性を調べることは，井戸水等の水媒介性の食中毒のリスク分析等に重要である。また，別項目で検討する乾燥状態での生存性と水溶液中での生存性における不活化速度や感染性推定遺伝子検査法と感染価との相関性における相違を把握することも必要である。本研究では，水溶液にウイルスを接種後，経日的に感染価の推移を測定して，水溶液中でのウイルスの生存性を調べる。

ノロウイルスおよびネコカリシウイルスの各保存液を MEM 培地で希釈したウイルス液を 1.5ml チューブに 250μl ずつ分注したものを試験液とした。保存開始日を 0 日として，0，1，3，6，9 日にウイルス液を回収した。各回収日に 2 本のチューブを回収し，1 つは遺伝子定量，他方はネコカリシウイルスの感染価測定用として，供試時まで-80℃で保存した。遺伝子定量と感染価測定は「1)　乾燥状態での生存性試験」と同様に実施した。

(3)　海水での生存性試験

ノロウイルスは，下水放流水から海域に至った後，カキ等の二枚貝に蓄積されるまでの間，一定期間海水中に存在している。その間，太陽光，気温，その他の不活化因子の

影響を受ける。そのため，海水中に存在するウイルスの生存性を明かにすることは，ノロウイルスの環境における生存性を知るうえで重要である。

本研究では，透析膜にウイルスを接種後，海水中に放置して，経日的に感染価と遺伝子定量値の変化を調べる。夏では，紫外線照度が強くまた，気温も高いことからウイルスは不活化されやすいと考えられ，ノロウイルスが流行する冬季は，紫外線照射量は少なく，また，気温が低いため，不活化されにくいと考えられる。そのため，本実験は，夏期および冬期に実施した。

ノロウイルス GI および GII および代替えウイルスとしてネコカリシウイルスに加え，ヒトの腸管系ウイルスの 1 種であるコクサッキーウイルス B5 型について，海水中の保存試験を行った。

4 種類のウイルス保存液をネコカリシウイルスとノロウイルス GII，コクサッキーウイルス B5 型とノロウイルス GI の組み合わせで，それぞれ 2%牛血清加イーグル MEM 培地で 20 倍希釈したものを，さらに濾過滅菌海水で 10 倍希釈したものを 10ml ずつ，透析チューブに入れた。透析チューブを液が漏れないようにシールした後，海水に沈め，0 日目（対照），1 日目，4 日目，6 日目（夏期）または 5 日目（冬期），8 日目および 11 日目に回収し，凍結保存した。全ての検体の回収を終えた時点で，4 種ウイルスの遺伝子定量を行うとともに，ネコカリシウイルスは CRFK 細胞，コクサッキーウイルス B5 型は HEｐ2 細胞を用いて 50%感染終末点法で感染価を測定した。

(4) 低濃度次亜塩素酸ナトリウムを含む下水放流水での生存性試験

遊離塩素濃度が 0.4～0.6ppm になるように次亜塩素酸ナトリウムを添加した下水放流水にネコカリシウイルスおよびノロウイルス GII を添加し，17℃（冬季を想定）および 28℃（夏季を想定）で 30 分放置し，その生存性をネコカリシウイルスの感染価および感染性推定遺伝子検査法および対照法での遺伝子定量値を調べた。

(5) 加熱による不活化試験

各種温度条件におけるノロウイルス GII の不活化の程度を推定するために，ネコカリシウイルスの感染価および遺伝子定量値と比較した，ノロウイルス GII とネコカリシウイルスの各保存液を PBS(-)(PBS)または 10%ビーフエクストラクト加 PBS(-)(10%BE-PBS)で 50 倍希釈したもの 500μl を 1.5ml 微量遠心管に入れ，ヒートブロックにて，1 分，2 分，3 分，4 分，5 分間加熱した後，氷中で保存した。その後，感染性推定遺伝子検査法および対照法で遺伝子定量を行うとともに，ネコカリシウイルスの感染価を CRFK 細胞を用いて 50%感染終末点法で測定した。

2) 感染性推定遺伝子検査法の食品等の汚染実態調査への応用

本課題では，実際のノロウイルスに汚染された食品，下水流入水および放流水，患者糞便等を対象として，感染性推定遺伝子検査法を用いてノロウイルス RNA を定量し，リスク評価に必要なデータを得る。また，これまで実施されていた厚生労働省の通知法(従来法)についても実施し，従来法の結果と感染性推定遺伝子検査法による結果を比較する。そのことにより，これまで得られている各種のデータの意義付けを明確にする（従

来法による結果と感染性推定遺伝子検査法による結果があまり乖離しない場合は，これまでの遺伝子検査結果を概ね感染性ウイルス量とみなすことができ，両者の結果が大きく乖離する場合は，これまで得られている結果はノロウイルスの汚染リスクを過大評価していることになり，感染性推定遺伝子検査法により，改めて汚染実態調査を実施する必要性を示すことになる）。

(1)　食品

ノロウイルスの汚染リスクが最も高い食品は二枚貝である。その中でも生食される可能性が高く，また，その制御が最も求められる二枚貝はカキであることから，カキを中心に検査を実施した。研究開始初期は，各研究所で凍結保存されているカキを検査材料として，流行期においては，凍結保存してない，新鮮なカキ検体を採取あるいは購入して検査に供した。本研究は数か所の地方衛生研究所等と共同で実施した。

（方法等の詳細は「Ⅲ　研究成果，考察，今後の課題」参照）

(2)　下水

カキ養殖海域の主要なノロウイルスの汚染源は下水であることから，下水から検出されるノロウイルスについてその感染性を把握することは極めて重要である。そこで，月１回程度の頻度で下水流入水と放流水を採取し，検査を実施した。これまで採取され保存されていた検体も検査対象とした。

本研究は，4 か所の地方衛生研究所等と共同で実施した。

（方法等の詳細は「Ⅲ　研究成果，考察，今後の課題」参照）

(3)　患者便

患者便は食品や下水から検出されるノロウイルスと比較して，感染性を保持している可能性が高い。そのため，患者便は感染性を保持しているウイルスの陽性コントロールとして用いた。

また，小児散発性感染性胃腸炎患者，食中毒事例等の集団発生における患者および調理従事者等から採取された便検体を用いて，抗体被覆粒子鑑別法の評価試験を行った。

本研究は 3 か所の地方衛生研究所等と共同で実施した。

（方法等の詳細は「Ⅲ　研究成果，考察，今後の課題」参照）

3　研究項目名：A 型肝炎ウイルスの生存性，不活化条件に関する研究(研究担当者名：石井　孝司，所属機関名：国立感染症研究所)

1)　個別課題：A 型肝炎ウイルスの生存性，不活化条件に関する研究

A 型肝炎ウイルス（遺伝子型 IA 1 株，IB 1 株，IIIB 2 株）について，20%ヒトアルブミン溶液中でウイルスを 60℃で 1 時間および 10 時間加熱し,感染価の減少を測定した。

4　研究項目名：E 型肝炎ウイルスの生存性，不活化条件に関する研究(研究担当者名：李　天成，所属機関名：国立感染症研究所)

1)　個別課題：E 型肝炎ウイルス 抗原検出系の樹立

E 型肝炎ウイルス様粒子(VLP)をウサギとモルモットに免疫し，抗 E 型肝炎ウイルス抗体を作製し，得られた抗体を用いて E 型肝炎ウイルス抗原検出 ELISA 法を構築した。

2)　個別課題：E 型肝炎ウイルスの熱安定性の検討

培養細胞で増殖した G1，G3 および G4 E 型肝炎ウイルスをそれぞれ 60℃，5 分，60℃，10，65℃，5 分，65℃，10 分間で熱処理した後，PLC/PRF/5 細胞に接種し，培養上清を 3 日から 4 日おきに採取し，培養上清のウイルス抗原およびウイルス遺伝子を測定した。

Ⅲ　研究成果，考察，今後の課題

1　研究項目名：遺伝子検査法の評価，開発(研究担当者：上間　匡，所属機関名：国立医薬品食品衛生研究所)

1)　個別課題名：感染性推定遺伝子検査法の横断的比較，評価および開発

(1)　感染性推定遺伝子検査法の横断的比較，評価および開発

①　横断的評価等に先立つ基礎実験

感染推定遺伝子検査法の横断的評価の実施に先立ち，各検査法で使用する RNase，エチジウム・モノアザイド等の濃度や反応時間等の基礎的検討を実施した(データ示さず)。また，ネコカリシウイルスの感染価の測定についてプラーク法及び限界希釈による 50%感染終末点($TCID_{50}$)を検討したが，不活化による広範囲の感染価の低下が容易に測定できること，また不活化に使用する消毒剤によるプラーク形成に対する影響が懸念されることから，ネコカリシウイルスの感染価測定には CFRK 細胞を用いた $TCID_{50}$ で行うこととした。

ウイルスの保存は一般に-80℃で行うため，試験時に融解する必要がある。従って，凍結・融解は実験を行う上で不可欠であることから，凍結融解の繰り返しによる感染価の低下の影響を把握しておく必要がある。ネコカリシウイルス(F9 株)の培養上清を用いて 7 回凍結融解を繰り返して，感染価を測定した結果，感染価はほとんど低下しなかった。このことから，数回の凍結融解は感染価および遺伝子定量値に影響を及ぼさないと考えられた。

②　横断的評価を行う検査法の選定

感染推定遺伝子検査法にはこれまで表 1 に示すいくつかの異なる原理に基づく検査法が報告されている。これらのうち，培養細胞への結合性を利用した検査法は，ウイルスの種類により結合可能な培養細胞が異なることから，汎用的に利用することはできない。また，ノロウイルスは CaCo2 細胞への結合性が判明しているが，その結合量は少なく，細胞の維持状態によって異なることから，食品や環境中のウイルスの定量的検出に応用することは困難であると考えられる。プロピオジウム・モノアザイド処理はエチジウム・モノアザイド処理と同様に，構造蛋白質が変性した(非感染性)ウイルス粒子から露出した遺伝子にプロピオジウム・モノアザイドが結合し，PCR 増幅を阻害することを原理としているが，エチジウム・モノアザイドと比較して，感染性粒子遺伝子検査法としては不向きであることが報告されている。以上のことから，今回の横断的評価には，蛋白分解酵素処理と RNase 処理の併用(Nuanualsuwan ら(2002)，Lamhoujeb ら(2008))，RNase 処

理(Topping ら(2008)),エチジウム・モノアザイド(EMA)処理(Kim ら(2011))を導入した方法について比較することとした。

③　感染性推定遺伝子検査法の横断的評価

その結果を図 4-1～6，図 5-1，図 5-2，図 6-1，図 6-2 に示した。

横断的評価は以下のように要約することができる。

① エチジウム・モノアザイドを用いる Kim らの方法では，ネコカリシウイルスでは他の方法と比較して不活化処理に伴い遺伝子定量値が低下しやすい傾向にあった。しかし，不活化していない(未処理)ウイルスの定量値が，従来法と比較してノロウイルスで約 20～30%，ネコカリシウイルスで約 3%に低下した。実際のカキ等の二枚貝や河川水などの環境材料中に存在するウイルス量は少ないことから，本法では，野外の検体への適応が困難な可能性がある。

② RNase 処理を基本原理とする 3 法には大きな違いは認められなかった。

③ いずれの処理方法でも，従来法と比較して，加熱により不活化されたウイルスの遺伝子定量値は低下傾向にあった。しかし，紫外線あるいは塩素による不活化(特にノロウイルスでは)では従来法と同程度の定量値であり，各処理の有効性は認められなかった。

④ ネコカリシウイルスは，これらの方法で評価した場合ノロウイルスと比較して塩素により不活化されやすい傾向が示唆された。

以上の感染性粒子遺伝子検査の横断的評価の結果,RNase 処理を用いる方法を基本として，検査法の改良を行うこととした。

④　検査法の改良の基本方針

自然環境や人為的なウイルスの不活化要因として，温度(気温，加熱殺菌)，紫外線(太陽光に含まれる紫外線，カキの浄化槽での紫外線照射)，塩素(下水処理場での塩素処理，嘔吐物処理における塩素消毒)が考えられる，横断的評価により加熱処理では従来の方法と比較して遺伝子定量値の低下が観察された(感染性/非感染性が区別される)が，紫外線処理および塩素処理では従来法と比較してほとんど遺伝子定量は変わらなかった。

また，別のウイルスの不活化要因として，感染後の免疫反応に伴う抗体による不活化(非感染性化)が考えられる。

以上のことから，検査法の改良に当たっては，

① 紫外線処理あるいは塩素処理で不活化されたウイルスの鑑別を可能にする

② 抗体で覆われたウイルスを検出できる検査法の開発

の 2 点を中心に研究を遂行することとした。ただし，抗体で覆われたウイルスの検出は，糞便中に排出されるウイルス粒子における抗体で覆われたウイルス粒子の存在割合や，ウイルスを被覆する抗体の本体(IgA だけなのか，IgG は関与しないのか)など，ウイルス学的に不明な点が多い。そのため，②の研究については，現時点では検査法に組み入れることは困難であることから，独立して研究を遂行した(「⑧　抗体被覆ウイルスの鑑別法の開発に関する研究」に記載)」。

⑤　検査法の改良

a)　紫外線処理への対応

紫外線によるウイルス不活化の主な作用機序は遺伝子の損傷(修飾，断片化等)である。また，塩素処理においても遺伝子への直接的な作用を示唆する報告もある。現在一般的に実施されているリアルタイム PCR 法は，ランダムプライマーによる逆転写反応の後，約 100b の遺伝子領域を PCR 増幅するものである。ランダムプライマーによる逆転写反応ではゲノムのほぼ全体に結合(アニール)するため，遺伝子損傷の影響を受けにくい。そのためゲノム全長（約 7,600b）のうち，PCR 増幅を行うわずか 100b 程度の領域における遺伝子の損傷しか検出に影響しないと考えられる。そこで，ゲノム上の損傷をより高感度に検出するために，オリゴ dT による逆転写反応を導入することとした。すなわち，オリゴ dT はゲノムの 3’末端に存在するポリ A に結合することから,3’末端からリアルタイム PCR 増幅領域までのゲノム上に損傷があった場合，逆転写反応が PCR 増幅領域まで伸長せず，リアルタイム PCR の標的領域の cDNA が合成されない。ノロウイルスのリアルタイム PCR 増幅領域は 3’末端から約 2,500b 上流に存在するので，ノロウイルスゲノム全体の約 1/3 の領域の遺伝子損傷を捉えることができると考えられる(図 7)。

そこで，紫外線処理あるいは塩素処理を行ったノロウイルスおよびネコカリシウイルスについて,Lamhoujeb らの方法(蛋白分解酵素処理後 RNase 処理を行う方法)で処理した後，ランダムプラーマーあるいはオリゴ dT プライマーで逆転写反応を行い，リアルタイム PCR 法で定量した(図 8)。その結果，ノロウイルスでは紫外線処理，塩素処理とも不活化による定量値の低下が顕著になったが,無処理時の定量値自体も約 1log 程度低下した。一方，ネコカリシウイルスでは顕著な影響はなかった。この理由は，ノロウイルスのリアルタイム PCR 増幅系は 3’末端から約 2,500b 上流に位置しているのに対し，ネコカリシウイルスのリアルタイム PCR 増幅系(NIHS-U)は 3’末端から約 200b 上流に設定されているため，オリゴ dT による逆転写反応でも遺伝子損傷の影響を受けにくいためと考えられた。このことを確かめるために， 山本らの方法(PCR 増幅領域が 3’末端から約 1,400b 上流に位置)と NIHS-U 法でリアルタイム PCR を行い，定量値を比較した結果(図 9)，予想どおり 3’末端から PCR 増幅部位までの距離が長くなるにつれて,不活化ウイルスの遺伝子定量値の低下を捉えることができた。

そこで，ネコカリシウイルスについてノロウイルスとほぼ同じ位置の遺伝子を増幅（3’末端から約 2,500b 上流に位置）する新しいリアルタイム PCR 増幅系(NIHS-N)を構築し(図 10)，加熱処理，紫外線処理あるいは塩素処理後のウイルス液を RNase 処理し，オリゴ dT プライマーによる逆転写反応で得た cDNA を用いて評価した。その結果，いずれの処理においても NIHS-N 法の不活化ウイルスの遺伝子定量値が低下し，感染性/非感染性の鑑別能の向上が確認された(図 11)。

b)　塩素処理への対応

塩素によるウイルスの不活化の作用メカニズムは不明な部分が多いが，遊離塩素による酸化作用によると一般的に考えられている。Shimizu らは酸化的障害を受けた赤血球膜タンパク質が膜に存在する酸化タンパク質分解酵素の一種である OPH(Oxidized Protein

Hydrolase，セリンプロテアーゼの一種)により選択的に分解されることを報告していることから，本酵素で塩素処理されたウイルス粒子が OPH により選択的に分解される可能性が考えられた。

OPH は TaKaRa の Aclamino-acid- releasing enzyme(AARE，タカラバイオ製 TKR7301)と同じものであることから，塩素処理したウイルスを AARE で作用し定量した結果，対照と比較して違いは観察されなかった。反応条件等について詳細な検討が必要と思われた。

c) 検査感度の高感度化

オリゴ dT プライマーの導入により，より高感度に不活化ウイルスを鑑別できるようになったが，未処理検体の検出感度が低下したので，高感度化の必要性が生じた。そこで，検査感度の高感度化を目的として，RNA 抽出法，逆転写反応および DNase 処理について検討した。

① RNA 抽出

現在一般に使用している RNA 抽出キットは濃縮効率を上げるためのキャリア RNA としてポリ A を使用している。しかし，オリゴ dT で逆転写反応を行う場合，ポリ A は競合阻害の原因となる。そこで，ポリ A の替りに，ウシ由来 t-RNA(CtRNA)，酵母（イースト）由来 t-RNA(Y tRNA)について検討した結果，ウシ由来 t-RNA が優れていることが判明した(図 12-1～3)。

② 逆転写反応

逆転写反応に広く使用されている 3 社 4 種類の逆転写酵素について比較を行った。当所で常用している酵素が最も優れていた(図 13)。逆転写反応の反応時間を 1 時間から 2 時間にすることで，定量値が向上した((図 12-1～2))。

また，逆転写反応効率の改善が見込まれる試薬の有無について比較した結果，若干定量が向上した(図 14)

③ RNA 抽出キット

広く使用されている 2 社 2 種類の RNA 抽出キットについて比較を行った結果，現在厚生労働省からノロウイルス検出法に記載され，当所で常用しているキットと比較して，今回比較対象としたキットによる定量値が高かった(図 15)。

④ DNase 処理

通常の DNase 処理では,DNase の不活化による加熱等により RNA 定量値自体も低下する(データ示さず)。そこで RNA 抽出を行う際に抽出用カラム内で DNase 処理を行うオンカラム DNase 処理を検討した(図 16)。DNA は完全には分解されないものの，RNA の定量値に影響はなく，有用な方法と考えられた(図 17)。

以上の高感度化のための検討結果を表 2 にまとめた。

d) 蛋白分解酵素処理の必要性

前記「③ 感染性粒子遺伝子検査の横断的評価」において RNase 処理を基本とする 3 法に大きな違いがなかったことから，蛋白質分解酵素処理の必要性について検討した。ネコカリシウイルスの塩素処理において若干蛋白質分解酵素処理を導入したほうが不活化の影響をより反映すると思われたが，それ以外では両法に違いは認められなかった(図

18)。

⑥　開発法(感染性推定遺伝子検査法暫定版)の評価

以上の検討の結果，暫定的な感染性推定遺伝子検査法を構築し，現在の PCR 試験法と比較した。その結果，前記「③　感染性粒子遺伝子検査の横断的評価」で実施した加熱処理，紫外線処理，塩素処理のいずれにおいても，現在の PCR 試験法と比較して，不活化の程度をより反映していると考えられる定量値が得られた(図 19-1～3)。

⑦　開発法(平成 24 年度感染性推定遺伝子検査法暫定版)の改良

食品や下水等の環境からの検出への感染性推定遺伝子検査法の適応を想定し，ネコカリシウイルスを検体に添加し，その回収率を把握するとともに，ネコカリシウイルスにおける感染性推定遺伝子検査法での定量値と従来法での定量値の比を基準として，検体中のノロウイルスの回収率及び感染性粒子の存在比を推定する方法の確立を目的とした検討を行った。本法を用いた場合，図20に示したように，従来法および開発法で得られる定量値の信頼性がより高くなることが期待される。添加回収用ウイルスに求められる条件として，データがばらつかない，目的とするノロウイルスの定量値に影響しない，目的ウイルスとともにマルチプレックスリアルタイムPCRが可能であるなどが必要であることから，それらを中心に検討した。

最初に添加回収用ウイルスの添加量について検討した。10^1～10^4/5μl 程度のノロウイルス　GII　cDNA について 20 ウエルについて測定した結果，10^2/5μl 以下の濃度ではデータのバラつきが大きくなった。このため，添加回収用ウイルスとしては，実測値として 10^3程度の量が適当であると考えられた。

次に，ネコカリシウイルスの添加によるノロウイルス GII の定量値の影響を調べた。その結果，ネコカリシウイルスを実測値 10^6コピー程度加えると，ノロウイルス GII はすべて陰性となり，10^3程度加えると，ノロウイルス GII のコピー数が少なくなるにつれ，定量値が低下した(図 21)ことから，ネコカリシウイルスを添加することによりノロウイルスの定量値が影響を受けることが判明した。

この原因として，ネコカリシウイルスの RNA が大量に入ることによる逆転写反応における競合阻害が原因と考え，逆転写反応時間の延長による影響(図 22)や逆転写酵素の種類(図 23)等を検討したが，改善には至らなかった。

一方，リアルタイム PCR に使用するリアルタイム PCR 用のマスターミックス液(耐熱性合成 DNA 合成酵素，反応用バッファー等の混合液)について予備的に検討した結果，多くの研究所で常用されている Taqman® Universal PCR Master Mix(life technologies，UnivMM)と当所で汎用している Eagle Taq Master Mix with ROX(Roche，EagMM)とを比較した結果，後者では，ネコカリシウイルスの添加による影響をあまり受けないことが示唆された(図 24)。そこで，食品や環境からの検出用として推奨されている Taqman® Environmental PCR Master Mix 2.0(Life Technologies)を加え，検討した結果(図 25～図 28)，定量値が高くかつネコカリシウイルスの存在の影響を受けにくい，EagMM が優れていると判断した。

次に，検査法の簡便化および検査に係る費用の低減化を目的として，ネコカリシウイ

ルスとノロウイルスとを同時に測定するマルチプレックスリアルタイム法を検討した。ネコカリシウイルスとノロウイルスGIIとを同時に検出するマルチプレックスPCRでは，単独で検出する場合と比較して，定量値は低下するものの，ネコカリシウイルスの量の影響はなかった(図 29)。しかし，ネコカリシウイルスとノロウイルス GI とのマルチプレックスPCRでは，ノロウイルスGIのみを単独で定量する場合と比較して，ネコカリシウイルスの添加量が多くなるにつれて，ノロウイルスGI定量値が低下する傾向が認められた(図 30)。そのため，マルチプレックスPCRを行う場合は，ネコカリシウイルスとノロウイルス GII との混合が望ましいと思われ，検体数を増やして検討した。その結果，マルチプレックスPCRの場合，定量値が若干低下することが確認された(図 31)。そのため，実際のカキ等のノロウイルスの汚染量が少ない検体では，個別に定量することが望ましいと考えられた。

以上の結果,添加回収用ウイルスを添加する場合,実測値として10^3程度に加えること，マスターミックスはEagle Taq MM with ROXを使用することが望ましいと考えられた。

また，マルチプレックスリアルタイム PCR の導入については，個別に測定することが望ましいが，混合する場合は，ネコカリシウイルスとノロウイルス GII とを混合することがよいと考えられた。

一方，昨年度開発した暫定試験法を実際の下水や食品からの検出に応用した結果，特に下水では，開発法と従来法のバラつきが大きく，開発法の定量値が高いものも認められた。その理由として，下水中には微生物が多数含まれており，ランダムプライマーを用いる従来の方法では，プライマー等が他の微生物の核酸に消費され，ノロウイルスに使用される量が相対的に減少することから，定量値が低下するのに対して，開発法ではオリゴdTで逆転写反応を行うため，ポリAを持つものだけが対象となる(ウイルス以外では，mRNAのみ)ため，定量値の影響を受けにくい可能性が考えられた。そこで，大量のブドウ球菌DNAを含むパンソルビンを添加することによる定量値への影響を調べた結果，ランダムプライマーによる逆転写反応（従来法）では，パンソルビン添加により定量値がより多く減少し(図 32)，大量の DNA の影響を受けやすい可能性が示唆された。

そこで，ランダムプライマーによる逆転写反応における大量DNAの競合阻害の影響の軽減化を目的として，RNA抽出キットで得られたトータルRNAをさらに，mRNA結合磁気ビーズを用いて(ノロウイルスを含む)PolyAをもつRNAのみを回収する方法の有用性を検討した。その結果，オリゴdTビーズ処理を行うとパンソルビン（大量DNA）の影響が軽減され，大量のDNAの影響をうけにくくなるが，その影響は，オリゴdTプライマーによる逆転写反応で大きく，ランダムプライマーでの逆転写反応での改善効果はあまり認められなかった(図 33，図 34)。この理由として，RNA抽出時にRNAが切断されて，PolyAを持たない断片ができるなどが考えられたことから，抽出RNAおよび逆転写反応で得たcDNAの電気泳動を行ったが，得られたRNAは基本的にintact（切断されていない）であると思われた(図 35)。また，複数のmRNA抽出キット等の検討(図 36)やトータルRNAによる抽出を行うことなく直接検体からmRNAを抽出する方法,Dynabeadsの使用方法(高感度化)の検討(図 37)」等を検討したが，ランダムプライマーによる逆転写反応による定量値の改善にはつながらなかった。

以上の検討結果，特に下水では開発法と従来法のバラつきが大きく，開発法の定量値が高いものも認められたが，その原因として，大量の DNA が存在すると，オリゴ dT よりランダムプライマーによる逆転写が影響を受け，定量値が低下することがその要因のひとつと考えられた。オリゴ dT 結合ビーズで精製すると大量 DNA の影響は軽減されるが，その程度は，オリゴ dT のほうが大きく，ランダムプライマーによる逆転写反応による定量値の改善には至らなかった。

以上の検討の結果，さらなる検査法の改善を行うことができた。改善した検査法平成 25 年度の食品等の汚染調査の検査法として示した。

⑧　抗体被覆ウイルスの鑑別法の開発に関する研究

一般にウイルス感染が起きた場合，免疫系の刺激により産生された特異抗体がウイルス粒子に結合し，ウイルス粒子の感染性が失活するとともに体外に排除され，回復に至る。ノロウイルス感染において，症状は一般的に 1～3 日で消失するが，糞便中には症状消失後 1～2 週間程度，長い場合 1 か月程度ウイルス粒子の排出が続く。糞便中には抗体被覆粒子も存在すると考えられ，事実，電子顕微鏡観察で，抗体に覆われていると思われる粒子像が観察される場合がある。しかし，抗体被覆粒子の存在割合やその経時的変化は不明である。また，ノロウイルスはしばしば不顕性感染を起こし，発症者と同程度のウイルス粒子数が糞便中に認められる場合があるが，不顕性感染者の場合，抗体被覆粒子が多く存在している可能性もある。さらに，腸管中に排出されたウイルス粒子に結合している抗体は分泌型 IgA 抗体を主体として，IgG 抗体や IgM 抗体が含まれると思われるが，抗体種ごとの関与の有無や程度も不明である。

抗体被覆粒子を非感染性粒子と仮定した場合，便，下水あるいはカキ等の食品媒介ウイルスの汚染リスクのある食品中の両者の存在比を明らかにすることは，食品のウイルス汚染リスクを正確に評価する上で重要である。また，調理従事者がノロウイルスに感染し，職場復帰する場合，抗体被覆粒子の有無を考慮した検査法が確立すれば，より正確に職場復帰の判断ができると考えられる。

そこで，本研究においては，抗体被覆粒子と非被覆粒子の鑑別法の確立を目的として，検討を行った。

a)　ELISA プレートによる抗体被覆ウイルスの除去

抗体被覆ウイルス粒子は，抗ノロウイルス抗体をコートした ELISA 用マイクロプレートに結合できないと考えられる(図 38)。そこで，ノロウイルス液に抗体(ガンマグロブリン製剤)を添加して，ELISA 用プレートへの結合の有無を調べた(図 39)。ELISA 法による吸光度測定では，抗体を添加しない場合は陽性，抗体を添加した場合は陰性となり，両者を明瞭に区別することができた。しかし，遺伝子定量値でみると，ウイルスの結合率は抗体無添加の場合で 2～5%程度，抗体添加(抗体被覆ウイルス粒子)の場合で 0.2～1.4%であった。このことから，ELISA プレートにより抗体被覆ウイルスをある程度除去することは可能であるが，抗体に覆われていないウイルス粒子の多くも ELISA プレートに結合していないため，本法を食品材料等における抗体被覆ウイルスを排除することを目的として感染性粒子検査法に導入することは現状では困難であると考えられた。

b) パンソルビンによる抗体被覆ウイルスの除去

パンソルビン(プロテイン A，ブドウ球菌菌体表面に存在する IgG 結合性蛋白質)は IgG 抗体に結合するため，ウイルス粒子が IgG 抗体に覆われていた場合，ウイルス-IgG-パンソルビンの複合体を形成する(図 40)。そのため，検体(ウイルス粒子を含む液体)にパンソルビンを添加すると，抗体(IgG)被覆ウイルス粒子はパンソルビンとともに低速遠心により沈澱するが，抗体に覆われていないウイルス粒子は沈澱せず，上清に残存すると考えられる。この原理を応用して，IgG 被覆ウイルス粒子の除去が可能か検討した(図 41)。用いる菌液は少なくても 3 回程度の洗浄が必要であった。抗体存在下(抗体被覆ウイルス)では，上清に残存するウイルス粒子は減少し，菌体に付着した粒子数は増加したことから，本法により抗体被覆ウイルスを除去することができる可能性が示唆された。しかし，抗体を含まない場合の上清のウイルス遺伝子定量値はパンソルビンを含まない場合(ウイルス対照)と比較して，約 1/3 に低下した。

そこで，パンソルビン存在下での遺伝子定量をより正確に行うために検討を行った。その結果，パンソルビンから直接Rocheのキットを用いてRNA抽出した後，High Capacity Reverse Transcription Kitを用いて逆転写反応を行うことにより，パンソルビンを含まない場合と比較して約38%～86%の定量値の定価にとどまることが判明した(図42)。これまでの方法では，logオーダーで定量値の低下が認められていたことから，定量法が改善できたと考え，検査法に導入することとした。

パンソルビン吸収法を感染性粒子推定遺伝子検査法に組み込むことを想定して，RNase 処理用 Buffer とパンソルビン吸収法に至適化された Buffer について，パンソルビンへの抗体被覆ウイルス粒子の結合率をノロウイルス GII 陽性患者便遠心上清にネコカリシウイルス(ネコカリシウイルスは基本的に抗体に覆われていない(=パンソルビンに吸着しない)と考えられる)を添加したものを材料として比較した。その結果，RNase 処理 Buffer では非特異的吸着が多い傾向にあった(図 43)。また，ガンマガード添加(抗ノロウイルス抗体が含まれるため，理論上ガンマガードを添加することによりパンソルビンに吸着するノロウイルス量が増加する)により，パンソルビンへの結合量はパンソルビン処理用 Buffer が増加する傾向にあった(図 44)。これらのことから，現状では，パンソルビン吸収法用バッファーを用いるほうが，抗体被覆粒子の有無の鑑別には適していると考えられた。一方，RNase 処理用 Buffer とパンソルビン処理用 Buffer における RNase による RNA の消化効率を見ると，パンソルビン処理用 Buffer の消化率が低い傾向にあった(図 45)。以上の結果より，パンソルビン処理による抗体被覆ウイルスの鑑別を行う場合には，パンソルビン処理用 buffer を導入することとした。(パンソルビン処理を感染性推定遺伝子検査法に導入するためには，Buffer 等の検討をさらに行う必要がある)。

これらの検討結果から，パンソルビン処理による抗体被覆ウイルス粒子鑑別法（暫定版）を作成し，その有用性について患者便を用いて検討した。

c) IgG 結合性カラムによる抗体被覆ウイルスの除去

上記 2 法と同様に，IgG 結合性カラムを使用することにより，抗体(IgG)被覆ウイルス粒子を捕捉し，除去することが可能と考えられる。そこで，ノロウイルス GII が検出さ

れた発症者由来の糞便材料 4 検体，不顕性感染者から経日的に採取された糞便試料 3 組（6 検体）および 1 組（7 検体）を用いて，IgG 結合性カラムの有用性を検討した。10%乳剤として保存されていた各試料について，直接ウイルス遺伝子を抽出したものと，IgG 結合性を有するカラムに結合したものおよびカラムに結合しなかったものからそれぞれウイルス RNA を抽出し，リアルタイム PCR 法を用いて定量した。また，抗 IgA 抗体を各試料に反応させた場合についても検討した。

その結果，表 3-1～3 に示すように，①ウイルス粒子と IgG 抗体の複合体が糞便試料に含まれている可能性があること，②IgA 抗体と複合体を形成しているウイルス粒子がカラムに捕捉された可能性があること，などが示唆された。そこで，同法を用いて，発症者と非発症者，発症者と調理従事者等における抗体被覆粒子の存在比の比較等を例数を増やして検討することとした。

2)　個別課題名：感染性推定遺伝子検査法の有用性の評価

(1)　開発法による定量値と感染価との関連性

開発した感染性推定遺伝子検査法(暫定版)と実際のウイルスの感染性(感染価)との関連性を調べるために，ネコカリシウイルスについて遺伝子定量値と感染価の比較を行った(図 46)。加熱処理，紫外線処理，塩素処理のいずれにおいても，開発法は従来法と比較して感染性をより反映していた。しかし，一般に各種の不活化処理において開発法による遺伝子定量値の減少率より感染価の減少率が大きく，感染価が陰性(検出感度以下)になっても遺伝子は検出されるなど，両者は完全に一致はしていなかった。

ネコカリシウイルスの開発法遺伝子定量値と感染価の相関係数(R^2)をみると，加熱処理が 0.89，紫外線処理が 0.96，塩素処理が 0.8(図 47-1～3)であった。

また，ノロウイルスとネコカリシウイルスの遺伝子定量値の相関係数は加熱処理が 0.997，紫外線処理が 0.96，塩素処理が 0.875(図 48-1～3)であり，塩素処理ではネコカリシウイルスの遺伝子定量値が低下しやすい傾向にあった。このことから，塩素による不活化では，ネコカリシウイルスよりノロウイルスの抵抗性が高いことが示唆された。

また，加熱による不活化における感染価と遺伝子定量値の関連性を把握するために，60℃～95℃の加熱処理によるネコカリシウイルスの感染性とノロウイルス等の感染性推定遺伝子検査法および従来法による遺伝子定量値の相関性等を検討した。

また，ノロウイルス，ネコカリシウイルスおよびコクサッキーウイルスを海水中に保存し，それらの生存性とノロウイルス等の感染性推定遺伝子検査法および従来法による遺伝子定量値の相関性等を検討した。これらの検討結果については，「2-1)　個別課題名：感染性推定遺伝子検査によるウイルス生存性試験」に記載した。

(2)　開発法と従来法の併用による感染価の推定の試み

(1)で示したように開発法はこれまでの検査法と比較して感染性の有無をより反映できる遺伝子検査法であるが，感染性の有無を正確には反映していない。そこで，より感染性を正確に把握するために，開発法と従来法で測定される定量値の違い(定量値減少率)から感染価を推定する方法を今後検討したいと考えている。すなわち，理論上は不活化されていないウイルスでは感染性推定遺伝子検査法と従来法の定量値は同じであり，

不活化により両者の差が生じてくると考えられるので，その差(定量値減少率)を利用して，感染性粒子と非感染性粒子の存在比を推定するものである。

たとえば，表 4(加熱処理，紫外線処理，塩素処理)でみると，75℃で 2 分間の加熱処理の場合，定量値減少率は約 10%，感染価は未処理のウイルス量の 0.1%以下である。従って，その場合の感染性ウイルス粒子数は従来法で測定された遺伝子定量値の 0.1%以下と考えることができる。しかし，感染価減少率と遺伝子定量値減少率の相関性は不活化の種類や条件によって異なり(図 49-1)，また，自然界での不活化要因は複合的であり，定量値減少率と感染価の減少の関係は複雑である。しかしながら，種々の不活化による定量値減少率と感染価の関係を調べることで，少なくても X%以下の感染価であると推定することができる可能性がある。すなわち，ネコカリシウイルスの例(表 4)では遺伝子定量値減少率が 30～50%の時，感染価が最も高いのは紫外線照射 1 分間処理の 31,623(未処理の 23.7%)(図 49-2)なので，従来法で得られた遺伝子定量値の 23.7%以下が感染性粒子であると推定される。

今回は限られたデータなので，今後，さらに遺伝子定量値減少率と感染価の減少率との相関性(感染量推定係数)を求める必要がある。

本手法を実際の食品や下水中のノロウイルスの定量検査に適応し，従来法と感染性推定遺伝子検査法で得られた定量値に感染量推定係数を考慮することで，より正確に感染性粒子数を推定することが可能となると考えられる。

2　研究項目名：感染性推定遺伝子検査によるウイルス生存性試験と汚染調査への応用
(研究担当者：野田　衛，所属機関名：国立医薬品食品衛生研究所)

1)　個別課題名：感染性推定遺伝子検査法によるウイルスの生存性試験

(1)　乾燥状態での保存試験

ノロウイルスは患者が室内環境で嘔吐した場合，嘔吐物に含まれるノロウイルス粒子が感染源となり，集団発生に至る場合が多い。特に，嘔吐物の処理が不十分で，カーペット等に残存したウイルスが乾燥して，空気中に浮遊し，感染源になることも指摘されている。そのため，乾燥した状態で存在するウイルスがどの程度感染価を保持するかを調べることが重要である。本研究では室内環境に残存し，乾燥したウイルスがどの程度感染性を保持するかを推定するために，ステンレスバットにウイルスを塗布後，乾燥させた後，経日的に感染価等の推移を測定して，乾燥状態でのウイルスの生存性を調べた。

清浄環境(0.5%アルブミン加 MEM)の風乾(安全キャビネット内でファンを可動し，強制的に乾燥させる)で得た乾燥状態では，ネコカリシウイルスの感染価および開発法により遺伝子定量値は乾燥した日に陰性化した(図 50-1)。一方，従来法では，10 日目まで徐々に遺伝子定量値が低下し，15 日目に陰性化した後，微量の遺伝子の検出の有無が 181 日目まで継続した。一方，自然乾燥で得た乾燥ウイルスでは，ネコカリシウイルスの感染価は同様に乾燥した日に陰性化したが,開発法による遺伝子定量値はそれよりやや遅れ 2 日目にかけ急激に減少した後，微量の遺伝子の検出が 181 日目まで継続した。従来法では，遺伝子定量値は 85 日まではほとんど減少せず 1log 程度の低下にとどまり，以降徐々に低下した。

汚染環境(10%牛エキス加 MEM)では，風乾で得た乾燥状態では，ネコカリシウイルスの感染価は 10 日目に陰性化した(図 50-2)。開発法による遺伝子定量値は乾燥した日に 2log 程度定量値が減少し，その後徐々に低下したものの，181 日目に初期ウイルス量と比較して 2～5log 程度の減少にとどまった。従来法では 181 日目でも，ほとんど遺伝定量値は低下しなかった。自然乾燥では，感染価は 62 日まで徐々に低下し，85 日目で陰性化した。開発法による遺伝子定量値は，乾燥した日の定量値が接種ウイルス量と比較して風乾の場合ほど減少していないことを除き，ほぼ風乾の場合と同様の傾向を示した。従来法の定量値も風乾の場合とほぼ同様で，181 日目までほとんど減少しなかった。

汚染環境(10%便上清添加 MEM)では，上記の清浄環境と汚染環境の結果の中間的な動向を示した(図 50-3)。この場合，風乾および自然乾燥において，ネコカリシウイルスと比較してノロウイルス GII は開発法での定量値の減少が早い傾向にあり，ネコカリシウイルスと比較して乾燥に弱い可能性が示唆された。

以上の結果より，以下のことが示唆された。

① 開発法は従来法と比較して，感染価とより近い遺伝子定量値を示す。その関連性は，清浄環境で高く，汚染環境では低い。

②ノロウイルスの乾燥状態における生存性は清浄環境で著しく低下する。本結果は清浄環境を維持することがノロウイルスの食中毒や感染性を予防する上で極めて重要であることを示唆する。

③汚染環境では，感染価は低下するものの，従来法ではほとんど遺伝子の低下が観察されなかった。拭き取り等で環境中のノロウイルスの検出は，従来法では相当長期間に渡り，検出されるため，感染性のないウイルスを検出する可能性が極めて高い。

(2) 水溶液中での保存試験

水溶液中でのウイルスの生存性を調べることは，井戸水等の水媒介性の食中毒のリスク分析等に重要である。また，乾燥状態での生存性と水溶液中での生存性における不活化速度や感染性推定遺伝子検査法と感染価との相関性における相違を把握することも必要である。本研究では，水溶液にウイルスを接種後，経日的に感染価の推移を測定して，水溶液中でのウイルスの生存性を調べた。

室温で保存した場合(図 51-1)，ネコカリシウイルスの感染価は 1 日で約 3log 低下し，3 日で陰性となった。開発法では，定量値は徐々に低下し，9 日で 2～3log の低下がみられた。従来法では 9 日の保存で定量値はほとんど変化しなかった。37℃で保存した場合(図 51-2)では，ネコカリシウイルスの感染価は 1 日で検出限界以下(約 4log 低下)となった。開発法では定量値は徐々に低下し，6 日で検出限界以下(4～5log 低下)となった。従来法でも定量値の低下が観察されたが開発法より少なく，9 日で 3～4log の減少に過ぎなかった。

以上の結果から，開発法は従来法と比較して，液体中のウイルスの生存性においてもウイルスの生存性を正確に把握できることが示された。

また，10%ビーフエクストラクト加 MEM で希釈したウイルス液を 37℃で放置した場合(図 51-3)は，MEM 培地で希釈したウイルス液と比較して感染価，遺伝子定量値とも減少率が低かった。このことから液体中においてもウイルスの生存性は清浄な環境(MEM)よりも汚

れた環境(10%ビーフエクストラクト加 MEM)においてウイルスの生存性が高くなることが示された。

(3) 海水での生存性試験

夏期の実験（図 52-1）では，ネコカリシウイルスの感染価は海水に沈めた翌日には陰性となり，遺伝子定量値もほぼ陰性に近い値となった。コクサッキーウイルス B5 型の感染価は徐々に低下し，4 日目まで検出され，6 日目に陰性化した。開発法の遺伝子定量値は感染価の動向とほぼ一致した。従来法の定量値も経日的に低下したが，低下率は低かった。ノロウイルスの遺伝子定量値は,コクサッキーウイルスB5型と同様の傾向を示し，経時的に低下した。

冬期の実験(図 52-2)では，ネコカリシウイルスの感染価は海水に沈めた翌日に 2log 以上低下した後，5 日目まで検出され，8 日目に陰性化した。感染性推定遺伝子検査法は感染価とほぼ同様の傾向を示し，8 日で陰性化したが，対照法では 11 日目まで検出された。0 日目において，感染性推定遺伝子検査法の定量値が対照法の定量値と比較して大きく低下（開発法/対照法の比＝0.03）していた（図 53）。

コクサッキーウイルス B5 型の感染価は 5 日目まではほとんど低下しなかった（1log 以内）が，8 日目に 3log 程度低下し，11 日目でも感染性粒子が検出された。遺伝子定量値をみると，感染価と概ね同様の傾向を示した。感染性粒子推定遺伝子検査法と対照法との定量値の比は 0.2～0.5 程度で，11 日目まであまり変わらなかった。

ノロウイルス GI と GII は概ね同じ動向を示した。遺伝子定量値は 11 日目まで徐々に低下したが，感染性推定遺伝子検査法による定量値の低下がより早かった。感染性粒子推定遺伝子検査法と対照法との定量値の比は継時的に増加する傾向にあり，特に GII で顕著であった。

夏期と冬期の結果をまとめ,0 日目の定量値あるいは感染価に対する相対比を対数で算出し，図 54 にまとめた。

以上の結果から，以下のことが示唆された。

① 夏期と比較して，冬期において，海水中での 4 種供試ウイルスの生存性は高くなる傾向にある。

② ウイルスの生存性はネコカリシウイルスが最も弱い。

③ ノロウイルス GI が夏期および冬期においても，生存性が高い傾向にある。

④ ノロウイルス GII は冬期の生存性は高いが，夏期においては生存性が低下する。

⑤ コクサッキーウイルス B5 型は 6（5）日までは比較的高い生存性を示すが。8 日目以降の生存性は大きく低下する傾向にある。

⑥ 海水中におけるノロウイルスの生存性を推定するためには，ネコカリシウイルスは適さない。コクサッキーウイルス B5 型はネコカリシウイルスよりノロウイルスの生存性に類似する傾向を示すが，必ずしも同じような傾向ではない。

(4) 下水放流水中での保存試験

遊離塩素濃度が 0.4～0.6ppm になるように次亜塩素酸ナトリウムを添加した下水放流水にネコカリシウイルスおよびノロウイルス GII を添加し，17℃（冬季を想定）および

28℃（夏季を想定）で 30 分放置し，その生存性をネコカリシウイルスの感染価および感染性推定遺伝子検査法および対照法での遺伝子定量値を調べた。その結果，ネコカリシは 17℃で感染価は 16%，感染性推定遺伝子検査法は 34%，対照法は 56%，また 28℃で感染価は 5%，感染性推定遺伝子検査法は 9%，対照法は 11%に減少したが，ノロウイルス GII はほとんど減少しなかった(図 55)。

本結果は遊離塩素を 0.4～0.6ppm 程度を含む下水放流水中での生存性は，ノロウイルスとネコカリシウイルスとは異なることを示している。また，ネコカリシウイルスの感染価および遺伝子定量値が低下した要因として，塩素による不活化に加え，下水放流水での安定性が低いことも想定される。

(5)　加熱による不活化試験

各種温度条件におけるノロウイルス GII の不活化の程度を推定するために，ネコカリシウイルスの感染価および遺伝子定量値と比較した。

各温度における定量値と感染価を図 56-1～7 に示した。また，加熱 0 分（対照）における定量値または感染価に対する相対比を図 57-1，図 57-2 にそれぞれ示した。

ネコカリシウイルスは，70℃以上で 3 分以上，85℃以上で 2 分の加熱で不活化した。PBS 希釈ウイルス液と 10%BE-PBS 希釈ウイルス液の比較では感染価および遺伝子定量値とも 10%BE-PBS 希釈ウイルス液が不活化されにくい傾向にあった。感染性推定遺伝子検査法の定量値は対照法と比較して，より感染価を反映した。

ノロウイルス GII の遺伝子定量値は，概ねネコカリシウイルスと同様の傾向にあった。PBS 希釈ウイルス液と 10%BE-PBS 希釈ウイルス液の比較では遺伝子定量値は 10%BE-PBS 希釈ウイルス液が低下しにくい傾向にあった。90℃，3 分間の加熱で感染性推定遺伝子検査法では PBS 希釈ウイルス液および 10%BE-PBS 希釈ウイルス液で遺伝子は検出されなかった。

以上の結果から，以下のことが示唆された。

① 加熱による不活化では，ネコカリシウイルスとノロウイルス GII とは概ね同じような傾向を示す。

② 有機物が多い状態では，ウイルスは加熱により不活化されにくい。

③ 加熱による不活化ではコカリシウイルスの生存性はノロウイルスの生存性を概ね反映する。

2)　個別は題名：感染性推定遺伝子検査の食品等の汚染調査への応用

「1-1)　個別課題名：感染性推定遺伝子検査法の横断的比較，評価および開発」で検討した内容を踏まえ，平成24年度および平成25年度にそれぞれ，食品等の汚染実態を実施するための暫定試験法を定めた。平成24年度は，従来法による結果と比較するために，開発法と従来法で試験を行った。また，検体中のウイルスがすべて感染性を持つ場合の対照試験として，患者便10検体程度について3回開発法と従来法で測定し，その幾何平均値を求め，従来法の定量値に対する開発法の定量値の比を求めた。

平成25年度の暫定試験法は，検査の簡素化のために，①RNase処理を行わない，②逆転写反応をオリゴdTプライマーの代わりにランダムプライマーで行うの2点のみを変更した方

法を対照試験とした。また，検体中のウイルスがすべて感染性を持つ場合の対照試験としては，ネコカリシウイルス培養液を検体に添加して，従来法の定量値に対する開発法の定量値の比を求めた。

本研究は，地方衛生研究所の協力を得て実施した。

(1)　カキの汚染実態調査への応用

①　国立医薬品食品衛生研究所での検討結果

添加回収試験に用いたネコカリシウイルス培養液について，感染性推定遺伝子検査法および対照法について定量試験を実施した。12 検体の幾何平均値(実測値)±標準偏差(log_{10}で表記)は，感染性推定遺伝子検査法が 3.95±0.13，対照法が 4.41±0.12 であり，対照法の定量値に対する感染性推定遺伝子検査法の定量値の比は，-0.46(実数変換値：0.34)であった(図 58)。一方，市販カキ 104 検体に添加したネコカリシウイルスの遺伝子定量値(中腸腺 1g あたり)の幾何平均値は，感染性推定遺伝子検査法が 4.62±0.86，対照法が 5.08±0.73 であり，対照法の定量値に対する感染性推定遺伝子検査法の定量値の比は，-0.46(0.34)であった(図 59)。

市販カキ 140 検体について，感染性推定遺伝子検査法と対照法でノロウイルス GI および GII について検査した。ノロウイルス GII で感染性推定遺伝子検査法および対照法の両法で定量値が得られたのは 16 検体であった。その定量値の幾何平均値は感染性推定遺伝子検査法が 1.47±4.97，対照法が 1.60±0.58 であり，対照法の定量値に対する感染性推定遺伝子検査法の定量値の比は，-0.75(0.18)であった。ノロウイルス GI で感染性推定遺伝子検査法および対照法の両法で定量値が得られたのは 2 検体であった。その定量値は感染性推定遺伝子検査法が 0.69±1.51，対照法が 0.69±0.87 であり，対照法の定量値に対する感染性推定遺伝子検査法の定量値の比は，-1.03(0.09)であった。ノロウイルス GII および GI とも例数がすくないが，いずれもネコカリシウイルスよりも，対照法の定量値に対する感染性推定遺伝子検査法の定量値の比は低かった。

定量値が得られた（定量値:>0）ものを陽性と判定し，市販カキ 140 検体の結果を表 5 に示した。ノロウイルス GI では感染性推定遺伝子検査法で陰性 137 検体(97.9%)，陽性 3 検体(2.1%)で，実測値 10 以上を示した検体はなかった。対照法では陰性 114 検体(81.4%)，陽性 26 検体(18.6%)，実測値 10 以上を示した検体 19 検体であった。それぞれの陽性例の幾何平均値は感染性推定遺伝子検査法が 5.5，対照法が 14.4 であった。ノロウイルス GII では感染性推定遺伝子検査法で陰性 124 検体(88.6%)，陽性 16 検体(11.4%)で，そのうち実測値 10 以上を示した検体は 1 検体だけであった。対照法では陰性 71 検体(50.7%)，陽性 69 検体(49.3%)，実測値 10 以上を示した検体 22 検体であった。それぞれの陽性例の幾何平均値は感染性推定遺伝子検査法が 1.5，対照法が 5.4 であった。

以上の結果から，以下のことが示唆された。①　添加したネコカリシウイルスの感染性推定遺伝子検査法定量値の対照法定量値に対する比は，接種ウイルスから直接得たものおよびカキ検体から回収したもの，そのいずれも 0.34 で同じ値を示した。このことから，ネコカリシウイルスはカキに添加後回収されるまではほとんどウイルス粒子は壊れておらず，安定であったと思われる。

②　一方，ノロウイルスについては感染性推定遺伝子検査法で陽性となった例は GI が 2

検体，GII が 16 検体と少なかったが，それぞれの感染性推定遺伝子検査法の対照法に対する比は 0.09，0.18 とネコカリシウイルスにおける比と比較して低い傾向にあった。このことから，カキには感染性のないノロウイルスが含まれている可能性が示唆された。
③　感染性推定遺伝子検査法の検出感度は対照法と比較して低いが，感染性推定遺伝子検査法では，明らかにカキ中のノロウイルスの検出率が低下した。

②　広島県での検討結果

2012年11月から5月まで定期的に採取したA県5海域のカキ及び2013年2月に購入した市販カキ7ロット並びにノロウイルス陽性患者便を対象として，平成24年度暫定感染性推定遺伝子検査法法および従来法あるいは平成25年度暫定感染性推定遺伝子検査法および対照法を用いてノロウイルスの検出を試み，開発法の有用性を評価するとともに，カキのウイルス汚染リスク評価に必要なデータの蓄積を図った。

a)　平成24年度の結果

患者便を用いて平成 24 年度暫定法(暫定法 1)と従来法でノロウイルス量を定量した。暫定法ではいずれの検体も従来法と比べ定量値が減少し（図 60），その比（暫定法 1/従来法）は 0.14～0.32 であった。実数換算での平均相対比は 0.285 であった。

河口域に近く比較的汚染程度の高い E 海域の検査結果を表 6 に示した。従来法に比べ暫定法 1(補正前)での検出ウイルス量は少なくなり，相対比はノロウイルス GI で 0.09～0.54，ノロウイルス GII で 0.04～0.06 であった。患者便での相対比 0.285 で除した暫定法 1（補正後）の値と従来法の値との相対比は，ノロウイルス GI で 0.33～1.89，ノロウイルス GII で 0.15～0.22 であり，一部で従来法の定量値より暫定法 1（補正後）の値が高くなるケースがあった。

また，海域 A～D におけるノロウイルス GI，GII の検査結果をそれぞれ図 61-1，図 61-2 に示した。海域 E の場合と同様に，従来法に比べ暫定法 1（補正前）では概ね検出ウイルス量が減少したが，E 海域同様に補正した暫定法 1（補正後）の値が，従来法の値より高くなることがあった。従来法での定量結果からノロウイルス GI では海域共通のピークは認められなかったが，ノロウイルス GII では B，C，D 海域において 1 月期に共通してピークが認められた。

b)　平成 25 年度の結果

河口域に近く比較的汚染程度の高い E 海域のカキの検査結果を表 7 に示した。対照法に比べ平成 25 年度暫定法（暫定法 2）の検出ウイルス量は少なくなり，両方法での相対比（暫定法 2/対照法）はノロウイルス GI で 0.46，ノロウイルス GII で 0.55～0.74 であった。また，海域 A～D におけるノロウイルス GI，GII の検査結果をそれぞれ図 62-1，図 62-2 に示した。海域 E の場合と同様に，従来法に比べ暫定法 2（補正）では概ね検出ウイルス量が減少した。

従来法での定量結果からノロウイルス GI，ノロウイルス GII とも海域共通のピークは 1 月期であった。1 月期の定量値を表 8 に示した。対照法でのノロウイルス GI とノロウイルス GII のウイルス量はノロウイルス GII がノロウイルス GI の約 15～25 倍量であった。両方法での相対比(暫定法 2/対照法)はノロウイルス GI で 0.38～0.46，ノロウイルス GII

で 0.17～0.66 であった。

2013 年 2 月購入の市販カキ 7 ロットについても同様に検査を行った(表 9)。対照法でのノロウイルス GI とノロウイルス GII のウイルス量はノロウイルス GII がノロウイルス GI の約 12～119 倍であった。暫定法 2 では，7 ロット中 1 ロットでしかノロウイルス GI は検出されなかったが，ノロウイルス GII は 5 ロットから検出された。検出されたノロウイルス GII の両方法での相対比（暫定法 2/対照法）は，0.21～0.89 であった。

なお，今回検査した検体に添加したネコカリシウイルスの対照法による定量での回収率は 0.2～75.4%（平均 30.7%），相対比（暫定法 2/対照法）は，0.03～2.24（平均 0.38）で，検体ごとの差が大きかった（データ示さず)。

c) 考察

感染性推定遺伝子検査法として暫定法1及び暫定法2について検討した。暫定法1では患者便での相対比（暫定法1/通常法）の値をもとにカキからの定量値を補正してカキ中の感染性ウイルス量を換算したが，一部の値が従来法の定量値を超える結果となった。一つの要因としては患者便中の感染性を有するノロウイルスの割合が低く，患者便での相対比で補正することが感染性ウイルスの定量値を過大に見積もってしまった可能性がある。ノロウイルスは細胞培養ができないことから，患者便中に感染性ウイルスがどの程度含まれているのかは不明である。また，暫定法1と従来法で用いたRNA抽出キットのウイルスRNA抽出効率の差，カキからのノロウイルス回収率も結果に影響していると考えられる。

暫定法2ではこの点を考慮し，内部標準として検体にネコカリシウイルスの添加を行い，このネコカリシウイルスの相対比（暫定法/対照法）をもとにカキからウイルス検出量を補正した。暫定法2での定量値はほぼ対照法の定量値以下に収まった。また，ノロウイルス GI ではノロウイルス GIIに比べ暫定法2で不検出となる割合が高かった。このことは，定期的に一か月毎に採取したカキ及び2013年2月に購入した市販カキを用いた検査結果とも同様で，カキ中のノロウイルス GIのウイルス量がノロウイルス GIIに比べ1オーダー以上少ないことが関係していると思われる。また，定期的に採取したカキの検査結果から，1月期のカキで検出率，検出量が上昇することが明らかになった。2012/13シーズンにおけるノロウイルス患者数のピークが12月初旬であることから，人での流行から1か月遅れでカキ中に蓄積されたと考えられた。なお，カキに添加したネコカリシウイルスの回収率，相対比（(暫定法2/対照法）は一様ではなく，検体ごとにかなり差が認められた。カキのロット間の影響なのか，ネコカリシウイルスに起因するのか，今後確認する必要があると思われる。

d) まとめ

暫定法1では患者便での定量値の相対比(暫定法1/従来法)を使って補正したことにより，感染性ウイルス定量値が従来法での定量値を超える結果となった。一方，暫定法2ではネコカリシウイルスを内部標準に用い，この定量値の相対比（暫定法2/対照法）で補正することにより感染性ウイルス量の推定値が概ね対照法の値を超えることはなくなった。また，暫定法2でのカキの検査結果から，カキ中の感染性ノロウイルスの推定量はGIよりGIIでの検出率が高いこと，2012/13シーズンにおいては1月期に検出率，検出量が上昇することが示唆された。

③　大阪市での検討結果

平成24年度はノロウイルス陽性糞便材料8検体および加熱調理用市販生カキ4ロット，平成25年度はノロウイルス陽性糞便材料7検体および加熱調理用市販生カキ4ロットを対象として，平成24年度暫定感染性推定遺伝子検査法法および従来法あるいは平成25年度暫定感染性推定遺伝子検査法および対照法を用いてノロウイルスの検出を試み，開発法の有用性を評価するとともに，カキのウイルス汚染リスク評価に必要なデータの蓄積を図った。

a)　平成24年度の結果

表 10 に糞便中のノロウイルス GII の定量値を示した。従来法の方が高い定量値を示したのは 2 検体（No. 3 および No. 6）であった。

表 11 にカキ中腸腺のノロウイルス定量値を示した。従来法の方が高い定量値を示したのは GI で 1 検体（No. 1-2），GII で 2 検体（No. 1-1 および No. 1-2）であった。GI では 4 検体（No. 2-1，No. 3-2，No. 4-1 および No. 4-2）が陰性であった。

b)　平成 25 年度の結果

表 12 に糞便中のノロウイルス GII の定量値を示した。すべて対照試験の方が高い定量値を示した。減少率（cT/C）は 2 検体（No. 1 および No. 2）を除いて 0. 040～0. 068 とバラツキの少ない値であった。

表 13 にカキ中腸腺のノロウイルス定量値を示した。対照試験では GI は 3 検体(No. 1-1，No. 2-2 および No. 3-2)，GII は 6 検体 (No. 2-2 のみ陰性) からノロウイルスが検出された。しかし，本試験ではすべての検体においてノロウイルス陰性であった。

表 14 にネコカリシウイルスの添加回収試験の結果を示した。糞便では回収率が対照試験で 71. 0%，本試験で 89. 0%であった。しかし，カキでは対照試験で 5. 7%，本試験で 0. 2%と回収率が著しく低かった。

c)　考察

平成24年度に行った方法で得られた定量値は，定量開発法の方が高い値を示す場合が多く，感染性粒子数を測定することができなかった。測定方法の検討が必要であると考えられた。

平成25年度では，糞便において対照試験の定量値の方が本試験よりすべて高い値を示し，ネコカリシウイルスの添加回収試験も良好な回収率であった。従って，糞便が対象の場合は，今回の方法で，ある程度の感染性粒子数を推定できるのではないかと考えられた。信頼度の高い測定方法として確立するためには，さらなる検証が必要である。カキにおいては本試験ですべてノロウイルス陰性となった。対照試験で得られた定量値が低く，ネコカリシウイルスの添加回収試験の回収率も低かったことから，本試験では検出限界以下になったと考えられる。ネコカリシウイルスの回収率で，糞便に比べてカキの方が著しく低かったことから，カキの前処理方法に問題があったことが示唆された。カキの前処理方法の問題は，ノロウイルスの定量値にも影響すると考えられ，今後問題点を明らかにして改善する必要がある。また，カキの添加回収実験で添加したネコカリシウイルスは，定量値で2

～$4x10^7$と高濃度であった。非常に少ないウイルス量を測定する場合に，大量のネコカリシウイルスがノロウイルスの定量値に影響した可能性がある。

d) まとめ

糞便中の感染性粒子の測定では，良好な結果が得られたと考える。今後，より正確に測定できるよう，検証が必要である。

カキ中の感染性粒子の測定方法については，今回の成果から評価することはできなかった。方法等の問題点を明らかにして，改善することが必要である。

(2) 下水中のノロウイルスの検出への応用

① 堺市における検討結果

平成23年12月，平成24年4月12月，平成25年1～3月，12月，平成26年1月に下水処理場3定点において採取した流入水19検体，放流水19検体，計38検体並びに感染性胃腸炎由来患者便８検体を対象とし，平成24年度暫定感染性推定遺伝子検査法法および従来法あるいは平成25年度暫定感染性推定遺伝子検査法および対照法を用いてノロウイルスの検出を試み，開発法の有用性を評価するとともに，カキのウイルス汚染の主要因となっている下水中のノロウイルスの感染性の把握に必要なデータの蓄積を図った。

a) 結果

便検体のノロウイルス測定結果から従来法と開発法の相対比は0.291であった(図63)。得られた相対比を基に補正した流入水の従来法の定量値に対する開発法の定量値の減少率はGIでは0.407，GIIでは0.515であった。放流水ではGIでは検出限界値以下となり算出不能であったが，GIIでは0.331であった（表15)。

下水にネコカリシウイルスを添加しノロウイルス測定を実施した。検討に用いた希釈調整ネコカリシウイルスの定量値は対照試験で平均 4,128copies/tube，本試験で平均392copies/tube，相対比 0.76 であった。ネコカリシウイルス添加回収率は対照試験では21～99%で平均54%，本試験では55～264%で平均106%であった。

対照試験および本試験におけるネコカリシウイルス相対比を基にノロウイルス GI および GII の本試験定値を補正した実数測定結果を示す(表16)。また，実数測定結果の対数変換結果を示す（表 17)。ネコカリシウイルス定量値における対照試験定量値に対する本試験定量値の減少率は流入水が 0.25，放流水が 0.14 となり，放流水が高い傾向にあった。GI測定では流入水の減少率は0.284であったが，放流水は検出限界値以下に低減されて算出不能であった。GII測定では流入水の減少率は0.195，放流水は0.103であった。

b) 考察

平成24，25年度において，推定感染性粒子測定を行ったところ，結果に年度間差がみられ，測定方法の相違によることが推測された。平成25年度の本試験でのネコカリシウイルス添加回収率は106%と対照試験の54%と比べて良好であった。本試験での測定法は感染性粒子をより補足して測定していると考えられた。

両年度の結果から，下水放流水の減少率の方が流入水の減少率よりも高い傾向にあり，

下水放流水には流入水と比較し，不活化されたウイルスの割合が高く含まれている可能性が推測された。

c） まとめ

感染性推定遺伝子検査を実施することにより，下水の流入水および放流水における感染性粒子の割合を推測することができた。

② 福岡県における検討結果

平成24年11月から平成25年1月までの3ヶ月間，および平成25年11月から平成26年1月までの3ヶ月間に，毎月1回，都市部にあるA終末処理場および非都市部にあるB終末処理場において採取された下水流入水および放流およびノロウイルス陽性患者便6検体を対象として，平成24年度暫定感染性推定遺伝子検査法法および従来法あるいは平成25年度暫定感染性推定遺伝子検査法および対照法を用いてノロウイルスの検出を試み，開発法の有用性を評価するとともに，カキのウイルス汚染の主要因となっている下水中のノロウイルスの感染性の把握に必要なデータの蓄積を図った。

a） 糞便検体を用いた開発法と従来法の比較

平成 24 年度暫定法（開発法 1）により糞便 6 検体のノロウイルスを 3 回ずつ定量した結果，糞便 0.7g に含まれるコピー数の平均は，対数でそれぞれ 8.0，8.4，8.3，8.5，8.3 および 6.2 であり，平均で 7.9 であった（表 18）。従来法により糞便 6 検体のノロウイルスを 3 回ずつ定量した結果，糞便 0.7g に含まれるコピー数の平均は，対数でそれぞれ 9.0，9.8，9.3，10.1，9.2 および 7.0 であり，平均で 9.1 であった。従来法に対する開発法の比は，対数で-1.14，実数で 0.073 であった。

b） 下水検体を用いた開発法と従来法の比較

各終末処理場において採取された流入水 6 検体および放流水 6 検体について，本試験および対照試験により，ネコカリシウイルス，ノロウイルス GI およびノロウイルス GII の定量を行った。ネコカリシウイルスの添加量は対照試験における定量値が 10^3程度になるように添加した。

対照試験と本試験の検出感度差について補正を行うためネコカリシウイルスを用いた。ネコカリシウイルスの定量値について対照試験の定量値に対する本試験の定量値の比（相対比）を求めると，A 終末処理場では，流入水が 0.37，放流水が 0.10，全体で 0.25 であった（表 19-2, 表 20-2）。B 終末処理場では，流入水が 0.37，放流水が 0.08，全体で 0.24 であった。（表 21-2, 表 22-2）。これらのことから，対照試験の定量値に対する本試験の定量値の減少率は，流入水より放流水が高い傾向にあることが明らかになった。

A 終末処理場の流入水および放流水について，ノロウイルス GI およびノロウイルス GII の相対比を実数で算出すると，流入水では，ノロウイルス GI は 0.645，ノロウイルス GII は 0.427 であり，放流水では，ノロウイルス GI は本試験ですべて検出限界以下のため算出できず，ノロウイルス GII は 0.166 であった（表 19-1）。相対比を対数で算出した場合は，流入水では，ノロウイルス GI は-0.350，ノロウイルス GII は-0.387 であり，放流水

では，ノロウイルス GI は-4.264，ノロウイルス GII は-3.017 であった（表 20-1）。

B 終末処理場の流入水および放流水について，ノロウイルス GI およびノロウイルス GII の相対比を実数で算出すると，流入水では，ノロウイルス GI は 0.344，ノロウイルス GII は 0.406 であり，放流水では，ノロウイルス GI は本試験ですべて検出限界以下のため算出できず，ノロウイルス GII は 0.877 であった（表 21-1）。相対比を対数で算出した場合は，流入水では，ノロウイルス GI は-0.693，ノロウイルス GII は-0.404 であり，放流水では，ノロウイルス GI は-4.344，ノロウイルス GII は-2.825 であった（表 22-1）。

これらの結果から，流入水サンプルにおけるノロウイルスの相対比はネコカリシウイルスの相対比より高い傾向が認められた。

c） 考察

糞便検体を用いた開発法と従来法の比較により，開発法による定量値は従来法の定量値の7.3%であった。この理由として，両法における検出感度の違いが考えられるが，存在比率は糞便の保存状態により大きく左右されると思われることから様々な保存状態による影響を検討する必要がある。

下水を用いた検討では，検出感度の補正のためにネコカリシウイルスを用いたが，流入水と放流水の相対比が大きく異なっていた。このことはネコカリシウイルスが放流水中でより不安定で壊れやすいことが示唆しているが，この原因は不明である。流入水中のノロウイルス感染性粒子の存在比率を求めた結果は，ノロウイルス GIおよびノロウイルス GIIともに1.00を下回っていたことから，流入水中には不活性化されたウイルス粒子が存在する可能性が示唆された。しかし，放流水中のノロウイルスの量が少なく，本試験を用いて検出された検体が少なかったことから，下水処理能により感染性粒子の存在比率の低下率を評価するためにはより高感度に感染性粒子のみを検出する方法を開発するとともに，例数を増やして検討する必要がある。

d） まとめ

開発法を用いて感染性粒子の存在比率を評価する場合，検体の保存状況や，補正する内部標準の選択，下水の種類などの条件を統一し，評価することが必要である。開発法の改良を行うと共に，得られた結果を正しく評価するための基準を設定することが今後の課題である。

③ 岡山県における検討結果

平成23年3月及び4月に各月に2回また平成24年12月から平成25年12月までの間に各月に1回，岡山県内の下水処理施設において採取した流入水及び放流水並びに新鮮なノロウイルス陽性患者糞便を対象として，平成24年度暫定感染性推定遺伝子検査法および従来法（対照試験1）あるいは平成25年度暫定感染性推定遺伝子検査法および対照法（対照試験2）を用いてノロウイルスの検出を試み，開発法の有用性を評価するとともに，カキのウイルス汚染の主要因となっている下水中のノロウイルスの感染性の把握に必要なデータの蓄積を図った。

a) 結果と考察

新鮮な患者糞便は全てノロウイルスの感染性粒子で構成されていると仮定し，本試験の定量値補正のために，従来法と本試験の定量値の比(相対比)を算出した。9 検体について 3 回の試行を行った結果，平均相対比は 0.662 であった(図 64)。試験が若干感度は低下するものの，概ね同等の感度であった。

流入水及び放流水それぞれにおいて，従来法に対する本試験定量値の比(以下，本試験/対照試験 1 の比)を算出し，流入水と放流水で比較した。GI：本試験/対照試験 1 の比の平均は流入水で 0.247,放流水で 0.091 であり,流入水より放流水で大幅に低かった(表 23)。GII：本試験/対照試験 1 の比の平均は流入水で 0.192，放流水で 0.097 であり，流入水より放流水で大幅に低かった(表 23)。遺伝子群にかかわらず，本試験/対照試験 1 の比は流入水より放流水で大幅に低かったため，下水処理により感染性ノロウイルスが低減したと考えられた。

本試験の感度補正を行うため，各濃縮検体にネコカリシウイルスを添加し定量した値は対照試験 2 と本試験で同じになると仮定し，本試験の定量値補正のために，対照試験 2 と本試験の定量値の比(相対比)を算出した。実数の相対比は流入水で 0.55，放流水で 0.20，全体で 0.36 であった(表 24-2)。対数変換した相対比も同様に，流入水で 0.55，放流水で 0.21，全体で 0.34 であった(表 25-2)。ネコカリシウイルスを流入水及び放流水に添加し，対照試験 2 と本試験の定量値の比(相対比)を算出したところ，流入水と放流水で大きく異なっていた。流入水と放流水の違いがネコカリシウイルスの安定性に寄与している可能性が示唆された。

流入水及び放流水それぞれにおいて，対照試験 2 に対する本試験定量値の比(以下，本試験/対照試験 2 の比)を算出し，流入水と放流水で比較した。

GI：実数に基づく本試験/対照試験 2 の比の平均は流入水で 0.765，放流水で 0.232 であり，流入水より放流水で低かった(表 24-1)。対数変換値に基づく本試験/対照試験 2 の比の平均(実数変換後)は流入水で 1.141，放流水で 0.195 であり，流入水より放流水で大幅に低かった(表 25-1)。

GII：実数に基づく本試験/対照試験 2 の比の平均は流入水で 0.869，放流水で 0.315 であり，流入水より放流水で大幅に低かった(表 24-1)。対数変換値に基づく本試験/対照試験 2 の比の平均(実数変換後)は流入水で 0.796，放流水で 0.255 であり，流入水より放流水で大幅に低かった(表 25-1)。その結果，遺伝子群にかかわらず，本試験/対照試験 2 の比は流入水より放流水で大幅に低かったため，下水処理により感染性ノロウイルスが低減したと考えられた。

b) まとめ

本試験のノロウイルス定量値について新鮮糞便中のノロウイルス及びネコカリシウイルスによって算出した相対比により補正した。その結果，新鮮糞便による補正で一貫して良好な結果が得られた（データ示さず)。しかし，新鮮糞便による補正は，糞便自体の状態や各検体の直接的な補正ではない。そこで，ノロウイルスの代替ウイルスとして以前から数多くの研究に用いられてきたネコカリシウイルスを各下水検体に添加することで，本試験定量値の直接的な補正ができることが期待されたが，個々の下水検体では，本試験の補正

値が対照試験を上回る場合が多くあり,必ずしも適切な補正値が得られなかった(データ示さず)。このため,流入水及び放流水における対照試験と本試験の相対比を算出し比較した結果，下水処理によって感染性ノロウイルスの低減が示された。

今後はネコカリシウイルスによる補正について検討するとともに，他の代替ウイルスの活用も含めた検証が必要と考えられた。また，実際の感染価との相関性を明らかにする必要がある。

④ 岩手県における検討結果

平成22年10月から平成25年2月までの間に岩手県内4箇所の下水処理施設において採取された流入水14検体，放流水8検体，計22検体並びに平成24年11月にノロウイルス GIIが検出された患者便9検体を対象として，平成24年度暫定感染性推定遺伝子検査法法および従来法あるいは平成25年度暫定感染性推定遺伝子検査法および対照法を用いてノロウイルスの検出を試み，開発法の有用性を評価するとともに，カキのウイルス汚染の主要因となっている下水中のノロウイルスの感染性の把握に必要なデータの蓄積を図った。

a) 平成24年度の検討結果

糞便を対象とした開発法および従来法の定量値（log10/g）は，開発法で 9.0，従来法で 9.3 と，開発法が従来法よりやや低く定量される傾向にあった（表 26)。

流入水における開発法／従来法の定量値の比は GI で 0.80，GII で 0.01，それに対し放流水では，GII で-0.17 と低下した（表 27)。

b) 平成 25 年度の検討結果

開発法と対照法の定量結果（実数）を表 28，同（対数変換値）を表 29 に示した。対数変換値で比較すると，ネコカリシウイルスの定量値における対照試験の定量値に対する本試験の定量値の減少率は，流入水で 0.17，放流水で 0.04 と流入水より放流水が高い傾向にあった。流入水におけるノロウイルス定量値の減少率は，GI で 0.118，GII で 0.074，ネコカリシウイルス定量値の減少率は 0.17 とノロウイルスより高い傾向にあった。放流水におけるノロウイルス定量値の減少率は，GII で 0.037 と，流入水と比較して高い傾向にあった。流入水におけるノロウイルス定量値の減少率は，GII で 0.074，GI で 0.118 と，GII が GI より高い傾向にあった。

c) 考察

流入水および放流水におけるノロウイルス定量値の開発法（補正値）／従来法の比において，放流水が流入水に比べ低い傾向を示したことから，放流水にはより非感染性粒子が多く含まれていることが示唆された。

ネコカリシウイルスの定量値における対照試験の定量値に対する本試験の定量値の減少率では，流入水より放流水が高い傾向を示した。放流水中の成分がネコカリシウイルスに影響したことが推察されるが，その理由は不明である。

流入水において，ノロウイルス定量値の減少率は，ネコカリシウイルス定量値の減少率より高い傾向が認められた。このことから，下水流入水中のノロウイルスに不活化さ

れたウイルスが存在する可能性が推察された。

放流水の減少率は流入水と比較して，高い傾向にあった。このことから，下水放流水には流入水と比較して，不活化されたウイルスがより多く含まれる可能性が示唆された。

流入水における減少率は，GII が GI より高い傾向を示した。このことから GII が GI よりも不活化されやすい可能性も示唆されたが，今回の調査では，個別のデータについてバラつきが大きいことや，放流水のノロウイルス陽性数が少ないことから，より信頼性の高いデータを得るため今後もさらに検討が必要である。

d) まとめ

開発法による下水からのノロウイルス検出を試みたところ，放流水は流入水より不活化されたウイルスの割合が多いと考えられた。

(3) 患者便における抗体被覆粒子/非被覆粒子鑑別の応用

① IgG 結合性カラムを用いた抗体被覆粒子鑑別法の検討(東京都)

ノロウイルス陽性胃腸炎患者糞便を用いて，IgG 結合性カラム吸収法の抗体被覆粒子/非被覆粒子鑑別における有用性を検証するとともに，同法を用いて患者便中の抗体被覆粒子の存在比等を明らかにし，便中のノロウイルスの感染リスク等に有用なデータの蓄積を図った。

複数回にわたってノロウイルスが検出された３例（事例 A，B，C）の糞便試料６件，長期にわたってノロウイルスが検出された１例（事例 D）の糞便試料７件，調理従事者からノロウイルスの検出された２集団食中毒事例由来の糞便試料（発症者７件，調理従事者 15 件）および不顕性感染者を検出した集団胃腸炎事例 11 事例（ノロウイルス検出：９事例，サポウイルス検出：２事例）由来の糞便試料 76 件（発症者 41 件，不顕性感染者 35 件）を供試材料とした。

ウイルス-抗体複合体の測定は，10%糞便乳剤を binding buffer と混合したのちに ProteinG でコートされたカラム（GE HealthCare）に添加した。反応後にカラムを洗浄し，カラムに捕捉されたウイルス-IgG 複合体を buffer AVL（QIAGEN）により処理し遠心操作により回収を試みた。得られた回収液から RNA を抽出し，逆転写反応の後に real-time PCR 法によりノロウイルスまたはサポウイルス量の測定を実施した。またカラムへ添加前に，抗 IgA 抗体を作用させることにより，同様の方法を用いてウイルス-IgA 複合体の回収も試みた。概略を図 65 に示した。

a) 結果

複数回にわたってノロウイルスが検出された３例（事例 A，B，C）では，２回目のウイルス検査時には糞便試料に含まれるウイルス量そのものが減少していたため，明確な傾向は認められなかった（図 66）。そこで 45 日間に７回ノロウイルスの検出された事例 D の試料において検索を実施したところ，時間経過により試料に含まれるウイルス量の減少は同様であるが，日数の経過により抗体の結合していない粒子が増加する傾向が認められた（図 67）。

調理従事者からノロウイルスが検出された事例の試料を用いて，発症者と調理従事者糞

便資料中に含まれるノロウイルス-抗体複合体の量を比較した。糞便中に含まれる total なノロウイルスの量と比較し，調理従事者の糞便試料に含まれるノロウイルス-IgG 複合体の量は有意差は認められないものの発症者より少ない傾向であった（図 68）。

発症者と不顕性感染者において糞便試料中の total なウイルス量や各分画における測定値はいずれも有意差が認められなかった。しかし，ノロウイルス-IgG 複合体を含む分画は，発症者と不顕性感染者の測定値の分布が近く，total な量に占める割合は発症者 14.5%，不顕性感染者 17.9%と不顕性感染者群の方が高い割合を示した（図 69）。また，共通食の喫食後の時間経過と各測定値の分布を解析したところ，喫食後ノロウイルスでは 3 日後，サポウイルスでは 5 日後にはウイルス-抗体複合体が検出された（図 70）。

b） 考察

これまでにも不顕性感染者の糞便中に含まれるウイルス量が発症者と有意差がないことを報告してきたが，不顕性感染者はウイルス性集団胃腸炎において，調理作業への従事や施設内へのウイルスを持ち込む可能性など感染拡大に重要な問題点となっている。ノロウイルスあるいはサポウイルス胃腸炎において不顕性感染が成立する機構については不明であるが，電子顕微鏡におけるウイルス観察時に抗体が付着したと推測されるウイルス粒子を観察する場合があり，なんらかの免疫状態の違いも考えられる。そこで糞便試料中に含まれるウイルス-抗体複合体について測定を試みた。感染成立後の時間経過により特異的な抗体産生などの免疫反応がみられることが予想されたが，経日的に採取された試料ではそこに含まれるウイルス量そのものが減少していくため，明確な傾向が把握できなかった。しかし，発症者と調理従事者との比較において，調理従事者におけるノロウイルス-IgG 複合体の量が有意差は認められなかったものの発症者群より低値に分布しており，抗体の結合していない粒子の割合が高いことが推察された。この傾向は同時に喫食する機会のあった不顕性感染者において，ノロウイルス-IgG 複合体の測定値の total な量に占める割合が不顕性感染者群の方が高い割合を示した分布と異なっており，両群の感染からの経過日数の差による可能性も考えられた。また，ウイルス-抗体複合体は供試したすべての試料から検出され，共通食の喫食後ノロウイルスは 3 日後，サポウイルスは 5 日後において検出された。このことからそれまでに獲得していた抗体誘導性に加え，何らかの抗体の非特異的な結合の可能性も考えられた。

不顕性感染が成立する要因として，その他の腸内環境の影響も推察される。今後も得られた試料について解析を継続していきたい

c） まとめ

ウイルス-抗体複合体は供試したすべての試料から検出された。発症者と不顕性感染者の両群で測定した各分画に有意差は認められなかったが，total な量に占めるノロウイルス-IgG 複合体を含む分画の割合は不顕性感染者群の方が高い割合を示した。ウイルス-抗体複合体は共通食の喫食からノロウイルスは 3 日後，サポウイルスは 5 日後に検出された。

② パンソルビン吸収法による抗体被覆粒子/非被覆粒子鑑別法に検討（愛媛県）

ノロウイルス陽性小児胃腸炎患者糞便（感染症発生動向調査により小児胃腸炎患者から採取され，ノロウイルス GII 陽性が確認された糞便 19 検体）を用いて，パンソルビン吸収法の抗体被覆粒子/非被覆粒子鑑別における有用性を検証するとともに，同法を用いて糞便中の抗体被覆粒子の存在比等を明らかにし，便中のノロウイルスの感染リスク等に有用なデータの蓄積を図った。

パンソルビンによる吸収処理は，研究班で示された方法に準じた。パンソルビンによる吸収処理で得た IgG 被覆粒子分画，IgG 非被覆粒子分画，IgA+IgG 被覆粒子分画および IgA+IgG 非被覆粒子分画ならびに糞便乳剤遠心上清の 5 種類について,研究班で示された方法に準じ，RNA 抽出後 cDNA 合成を行い，得られた cDNA を鋳型 DNA として，通知法に従い，リアルタイム PCR 法によりノロウイルス GII 遺伝子を定量した。ただし，マスターミックス液は，Eagle Taq Master Mix with ROX(Roche)を用いた。

a) 結果

パンソルビンを用いた糞便中の抗体被覆粒子分画および非被覆粒子分画の定量結果を表 30 に示した。パンソルビン処理に伴う糞便中のウイルス粒子のロスの有無または，パンソルビンに含まれる黄色ブドウ球菌に由来する大量の DNA や RNA のノロウイルス GII 定量値に与える影響の有無を調べるために，IgG 被覆/非被覆鑑別法および IgA+IgG 被覆/非被覆鑑別法における，抗体被覆粒子分画の定量値と非被覆粒子分画の定量値の総和と糞便遠心上清から直接 RNA 抽出して得た定量値を比較した(図 71)。その結果，3 者の定量値は概ね一致したことから，抗体被覆粒子分画の定量値と非被覆粒子分画の定量値の総和は概ね糞便中のウイルス RNA 定量値とみなせると思われた。

各便材料における IgG 被覆粒子分画または，IgA+IgG 被覆粒子分画からの回収率および糞便中のウイルス RNA 量(糞便乳剤遠心上清から直接抽出後定量したもの)を図 72 に示した。IgA+IgG 被覆/非被覆鑑別法をみると，19 検体中 4 検体は 10%以上が抗体被覆粒子分画から回収され，最大で 72%の回収率であった。11 検体は抗体被覆粒子分画の回収率が 1%以下であった。

一方，IgG 被覆/非被覆鑑別法では，IgA+IgG 被覆/非被覆鑑別法と比較して，抗体被覆分画の回収率は低く，高いもので 19 検体中 2 検体が 7%程度，13 検体は 1%以下の回収率であった。

IgA+IgG 被覆/非被覆鑑別法で,抗体被覆粒子分画からの回収率が 1%以上を示した 8 検体中 6 検体は IgG 被覆/非被覆鑑別法でも 1%以上で，両者は概ね一致する傾向にあったが，IgA+IgG 被覆粒子分画からの回収率が高く，IgG 被覆粒子分画から検出されない例が 2 例（13-513，12-08）認められた。

IgA+IgG 被覆粒子分画からの回収率と糞便中のウイルス定量値，病日，患者の年齢および検出ノロウイルスの遺伝子型との間に関連性は認められなかった。

b) 考察

研究班で開発されたパンソルビンを用いた抗体被覆/非被覆粒子の鑑別法の有用性を,ノロウイルス陽性小児胃腸炎患者糞便を用いて検討した。その結果，IgA+IgG 被覆/非被覆鑑別法において 19 検体中 4 検体は 10%以上が抗体被覆粒子分画から回収され，最大は 72%の

回収率であった。これらの検体は，IgG 被覆/非被覆鑑別法では抗体被覆粒子分画の回収率は 7.5%以下であったことから,IgA+IgG 被覆/非被覆鑑別法での抗体被覆粒子分画から回収した粒子は主に IgA 抗体被覆粒子であると考えられた。また，IgA+IgG 被覆/非被覆鑑別法で陽性となり，IgG 被覆/非被覆粒鑑別法で陰性となった例が 2 例認められた。これらの例(13-513，12-08)においても IgA 抗体がウイルス粒子を被覆しているものと思われる。

今回，IgA+IgG 被覆粒子分画からの回収率が 72%と最も高かった検体は，14 歳，男児から 2 病日目に採取されたノロウイルス GII/2 陽性便であった。疫学的な情報から再感染の可能性が疑われる事例であることから，免疫応答が速やかに働き，便中のウイルス量が 2.6×108 コピー数/g と一般的なウイルス量であるにも関わらず,抗体被覆粒子が多く存在している可能性が考えられる。一方，腸管中に分泌型 IgA 抗体が大量に存在する場合，糞便中では抗体に覆われていなかった粒子が，パンソルビンによる吸収反応時にフリーの IgA 抗体と結合し，抗体被覆分画に回収される可能性も否定できない。今後，被覆/非被覆の各分画のウイルス RNA 定量値のパンソルビンによる吸収反応の時間依存性等を検討する必要がある。

今回，主に小児のノロウイルス患者便を対象とした検討の結果，パンソルビンを用いて抗体被覆/非被覆粒子の鑑別が行える可能性が示唆された。一方，抗体被覆粒子分画からの回収率と，糞便中のウイルス RNA 量，病日，年齢あるいは検出ノロイルスの遺伝子型との間に関連性を認めることはできなかった。今後，年齢，病日，また発症者/非発症者など，様々なノロウイルス感染事例について調査を行う必要がある。

c) まとめ

パンソルビンを用いた抗体被覆/非被覆ウイルス粒子鑑別法の有用性をノロウイルス陽性小児胃腸炎患者糞便 19 検体を用いて検討した。19 糞便検体のうち 4 検体は糞便中のウイルス量の 10%以上（最大 72%）が抗体被覆粒子分画から回収された。それらの多くは IgA 抗体被覆粒子であると考えられた。糞便中のウイルス量または病日と抗体被覆粒子分画からの回収率との間に，関連性は認められなかった。パンソルビン処理は，糞便中の抗体被覆ウイルス粒子と非被覆ウイルス粒子の鑑別に有用であると思われた。

③ パンソルビン吸収法による抗体被覆粒子/非被覆粒子鑑別法の検討(愛知県)

平成 25 年度に愛知県衛生研究所で検査した食中毒疑い 5 事例からのノロウイルス陽性糞便 5 検体と散発性感染性胃腸炎患者 3 検体を用いて，パンソルビン吸収法の抗体被覆粒子/非被覆粒子鑑別における有用性を検証するとともに，同法を用いて糞便中の抗体被覆粒子の存在比等を明らかにし，便中のノロウイルスの感染リスク等に有用なデータの蓄積を図った。

パンソルビンによる吸収処理は，研究班で示された方法に準じた。パンソルビンによる吸収処理で得た IgG 被覆粒子分画，IgG 非被覆粒子分画，IgA+IgG 被覆粒子分画および IgA+IgG 非被覆粒子分画ならびに糞便乳剤遠心上清の 5 種類について,研究班で示された方法に準じ，RNA 抽出後 cDNA 合成を行い，得られた cDNA を鋳型 DNA として，通知法に従い，リアルタイム PCR 法によりノロウイルス GII 遺伝子を定量した。ただし，マスターミックス液は，Eagle Taq Master Mix with ROX(Roche)を用いた。

a) 結果

表 31 に食中毒疑い患者 5 検体と散発性胃腸炎患者 3 検体について，全ウイルス量，抗体被覆ウイルスと非被覆ウイルスの定量値(糞便 g 当たりのコピー数)を示した。図 73 に定量値に基づいて算出した各検体中の IgA+IgG 被覆と非被覆，IgG 被覆と非被覆の合算ウイルス量及び直接定量したウイルス量を示した。いずれの検体でもログスケールで直接定量値と抗体被覆と非被覆の合算ウイルス量は概ね一致した。

図 74 に検体中の抗体被覆ウイルスの占有割合とそのウイルス量を示した。成人の食中毒患者由来検体は，小児の散発性胃腸炎患者検体と比べて，抗体被覆ウイルスの占有割合が高い傾向を認めた。

b) 考察

パンソルビンを用いて算出した抗体被覆ウイルス量と非被覆ウイルス量の合算値は，直接定量値と概ね一致したことから，本試験法で定量的に解析できたことが確認された。
次に，本法を用いて成人の食中毒患者由来検体と小児散発性胃腸炎患者検体について，検体中の抗体被覆ウイルス量の占有割合を比較したところ,成人検体は,小児検体と比べて,抗体被覆ウイルスの占有割合が高い傾向を認めた。その理由として，小児は成人と比べて多様な遺伝子型のノロウイルスに感染する機会が少なく，ノロウイルス抗体が備わっていないことが主たる要因と推察された。

今回，検討したパンソルビンを用いた抗体被覆ウイルス粒子と抗体非被覆粒子との鑑別法を用いてノロウイルス感染病態の詳細を把握できることが期待される。現時点ではヒトノロウイルスは培養不可であるので,患者糞便中の抗体被覆粒子の感染性は不明であるが,今後，ノロウイルス感染者の陰性確認検査に今回の鑑別法の導入も期待される。

c) まとめ

パンソルビンを用いてノロウイルス感染患者糞便中の抗体被覆ウイルスと抗体非被覆ウイルスを定量的に鑑別できた。さらに，例数を増やして，感染病日との関連性など感染病態の解明に応用したい。

3 研究項目名：A 型肝炎ウイルスの生存性，不活化条件に関する研究(研究担当者名：石井 孝司，所属機関名：国立感染症研究所)

1) 個別課題名：A 型肝炎ウイルスの生存性，不活化条件に関する研究

A 型肝炎ウイルスのうち，遺伝子型 IA 1 株，IB 1 株，IIIB 2 株について，20%ヒトアルブミン溶液中でウイルスを 60℃で 1 時間および 10 時間加熱し,titer の減少を測定した結果，1 時間の処理ではいずれも 10^1程度の titer の減少が見られ，10 時間の処理では株によってある程度の違いはあるものの 10^3から 10^4程度の titer の減少が見られた(図 75)。

A 型肝炎ウイルスは 60℃，1 時間処理ではウイルスの感染性は 1/10 程度までしか減少せず，さらに長時間の処理が必要であることが示された。温度をあげた場合の効果や，紫外線，次亜塩素酸で十分な感染性の減少が見られる条件についてさらに検討を進める必要がある。

4　研究項目名：E 型肝炎ウイルスの生存性，不活化条件に関する研究(研究担当者名：李　天成，所属機関名：国立感染症研究所)

1)　個別課題名：E 型肝炎ウイルス 抗原検出系の樹立

G1 E 型肝炎ウイルス様粒子(G1 E 型肝炎ウイルス-LPs)をそれぞれウサギとモルモットに 3 回に分けて，大腿筋肉に接種し，高力価な抗 E 型肝炎ウイルス抗体を作製した。ウサギ抗 E 型肝炎ウイルス抗体の抗体価は $5X10^6$,である。 モルモット抗 E 型肝炎ウイルス抗体の抗体価は $4X10^5$である。ウサギで作製した抗 VLPs 抗体をマイクロプレートに固相化し，糞便および血清中 E 型肝炎ウイルス抗原を捕捉した。モルモットで作製した抗 VLPs 抗体と HRP 標識抗モルモット IgG 抗体で抗原を検出した(図 76)。

検査法は下記の通りである。

1) ウサギプレ血清および組換え中空粒子免疫ウサギ血清をコーティング用緩衝液で 1:10,000 に希釈する。96 穴平底プレートの各ウェルに 100 µl 加え 4℃ に一夜置く。

2) 各ウェルの液を除き 150 µl の 5%SM/PBS を加える。37℃に 2 時間，あるいは 4℃ に一夜置く。

3) 各ウェルの液を除き PBS-T で 4 回洗浄する。

4) 10%患者便材料の遠心上清を 1%SM/PBS-T で希釈し 100 µl 加える。37℃ に 1 時間置く。

5) 各ウェルの液を除き PBS-T で 4 回洗浄する。

6) 組換え中空粒子免疫モルモット血清を 1%SM/PBS-T で 1:10,000 に希釈し 100 µl 加える。37℃ に 1 時間置く。

7) 各ウェルの液を除き PBS-T で 4 回洗浄する。

8)各ウェルに HRP-conjugated rabbit anti-guinea pig IgG ([Cappel catalog#57001]を 1%SM/PBS-T で 1:2,000 に希釈したもの)を 100 µl 加える。37℃ に 1 時間置く。

9) 各ウェルの液を除き PBS-T で 4 回洗浄する。

10) OPD 溶液に 30%過酸化水素水を 0.04% (v/v) 加える (OPD 溶液 12.5 mL に対して 30%過酸化水素水を 5 µl 加える)。各ウェルに 100 µl 加え遮光して室温に 30 分置く。

11) 4N 硫酸を各ウェルに 50 µl 加え反応を停止する。

12) 492nm の吸光度を測定する。

E 型肝炎ウイルス-LPs を抗原に用いた場合の検出感度は 0.5ng であった。同じ組換えバキュロウイルス発現系で作製した BK，JC，ノーウォークウイルスの VLPs との非特異的な反応は全く認められなかった。E 型肝炎急性期の患者糞便や E 型肝炎ウイルスが感染したカニクイザルの血液，糞便から本 ELISA 法で E 型肝炎ウイルス抗原を検出した。E 型肝炎ウイルス感染細胞培養上清から E 型肝炎ウイルス抗原の検出は可能である。

E 型肝炎ウイルス VLPs を免疫原として得られた高力価の抗体を用いた抗原検出 ELISA 法によって，E 型肝炎ウイルス抗原を効率よく検出することができた。この方法により，患者および感染実験動物のウイルスの排泄時期と期間を正確に把握することが可能になった。操作が簡単な抗原検出 ELISA 法は，培養細胞を用いた E 型肝炎ウイルスの増殖を観察に非常に有用である。

2)個別課題名：E 型肝炎ウイルスの熱安定性の検討

培養細胞で増殖したG3 E型肝炎ウイルスをそれぞれ50℃,55℃, 60℃, 65℃, 70℃,一時間で熱処理したあと, PLC/PRF/5細胞に接種し, 定期的に培養上清を回収してウイルスの増殖を観察した。その結果, 60℃℃, 一時間で熱処理したあと, ウイルスの増殖が見られなかった。さらに60℃,5分, 60℃,10分, 65℃,5分, 65℃,10分間で熱処理すると, 60℃,10分あるいは65℃,5分間での熱処理によりウイルスは不活化されたことが明らかになった（図77-79)。

5 研究全体の成果, 考察及び結論

1) 研究全体の成果と考察

これまで報告のある主な感染性推定遺伝子検査法について, 代表的な不活化要因である加熱, 紫外線, 塩素による処理を行ったノロウイルスおよびネコカリシウイルスの遺伝子定量値を指標に横断的な評価試験を実施した。その結果, 不活化に応じた遺伝子定量値の低下, 検出感度等を考慮した結果, RNase 処理を基本とした方法が優れていると判断された。一方, 加熱処理ではいずれの方法も従来法と比較して, 不活化により遺伝子定量値が低下(感染性/非感染性ウイルスを区別しやすい)したが, 紫外線, 塩素処理では大きな違いは認められなかった(感染性/非感染性ウイルスが区別できない)。

紫外線処理や塩素処理での感染性/非感染性ウイルスの区別が可能な検査法に改良することを主な目的として, RNA抽出, DNase処理, 逆転写反応等について検査法の改良を行った。その結果, それらの処理でも, 検出感度を落とすことなく, 従来法と比較して遺伝子定量値が低下する(感染性/非感染性ウイルスを区別しやすい)ように,検査法を改良することができた。以上の検討の上, 暫定的な感染性推定遺伝子検査法を開発した。また, 内部コントロールとしてネコカリシウイルスを用いて, その添加量の最適化等を図った。

抗体で覆われたウイルス粒子(感染性がないと思われる)を区別する方法として, ELISAプレート吸着法, IgG 結合性カラム処理法およびパンソルビン処理法などを検討した。その結果, IgG結合性カラム処理法およびパンソルビン処理法の有用性が示唆された。

一方, 感染性推定遺伝子検査法および2種類の抗体被覆粒子/非被覆粒子の鑑別法は, 一連の検査法として実施できることが望ましいが, 現状においてはそれぞれ独立した検査法にとどまっている。今後一連の検査法として実施できるように,改良することが望まれる。

加熱, 紫外線, 塩素による処理を行ったネコカリシウイルスの感染価を指標に開発法と従来法による遺伝子定量値を比較し, 有用性を評価した。その結果, 開発法は従来法と比較して感染価を反映した。また後述の各種の生存性試験においても, 開発法は従来法と比較して, 感染性をより反映する結果が得られ, その有用性が示された。

しかしながら,,開発法による遺伝子定量値の減少率より感染価の減少率が一般的に大きい傾向にあり, 感染価が陰性(検出感度以下)になっても遺伝子が検出されるなど, 両者は完全には一致しなかった。そのため, 現状においては, 開発した感染性推定遺伝子検査法で陽性となっても, 必ずしも, 感染性粒子を検出しているとは必ずしも言えない。

そこで,従来法と開発法で得られた定量値の差(従来法の定量値に対する開発法の定量値の割合・遺伝子定量値減少率)を利用して, より正確に感染性粒子を捉える方法を考案し, ネコカリシウイルスやコクサッキーウイルスB5型等培養可能なウイルスを用いて,従来法

と開発法で得られた定量値および感染価の関連性を検討した。その結果，ネコカリシウイルスは，後述のように，下水放流水や海水中での生存性はノロウイルスと比較して極めて弱く，遺伝子定量値の変化はノロウイルスと比較して大きく異なった。コクサッキーウイルスB5型もノロウイルスと比較して，遺伝子定量値の変化は必ずしも一致しなかった。

そのため，今後，本法を用いて開発法および従来法の遺伝子定量値および感染価の関連性から，より正確に感染性ウイルス量を推定できる方法を確立するためには，ノロウイルスと同様の遺伝子定量値の変化を示すウイルスを明らかにして，それを用いて関連性を調べる必要があると考えられた。

感染性推定遺伝子検査法を用いて，有機物の負荷の有無を考慮した乾燥状態および液体中での生存性試験,低濃度次亜塩素酸ナトリウム存在下での下水放流水中での不活化試験,,夏期および冬期における海水における生存性試験，および有機物が多い環境および少ない環境での加熱による不活化試験を行い，以下の結果を得た。

① 感染性推定遺伝子検査法は従来法と比較して，いずれの生存性試験においても，感染価をより反映する遺伝子定量値を示した。

② ノロウイルスの乾燥状態における生存性は清浄環境で著しく低下する。汚染環境では，感染価は低下するものの，従来法ではほとんど遺伝子定量値の低下が観察されなかった。

③ ノロウイルスの液体状態での生存性も清浄環境で著しく低下する。汚染環境では，感染価は低下するものの，従来法ではほとんど遺伝子定量値の低下が観察されなかった。

③ 遊離塩素を0.4～0.6ppm程度を含む下水放流水中で30分放置では，ネコカリシウイルスは感染価および遺伝子定量値が低下したが，ノロウイルスGIIはほとんど変化しなかった。

④ 夏期と比較して，冬期において，海水中でのウイルスの生存性は高くなる。生存性はネコカリシウイルスが最も弱く，ノロウイルスGIが高いと推定された。ノロウイルスGIIは冬期の生存性は高いが，夏期においては生存性が低下すると推定された。

⑤ 有機物が多い状態では，ウイルスは加熱により不活化されにくい。

⑥ 乾燥状態における生存性や加熱による不活化においてネコカリシウイルスとノロウイルスは概ね同じ傾向を示したが，海水や低濃度の次亜塩素酸ナトリウム存在下の下水放流水における生存性はノロウイルスと比較して，ネコカリシウイルスは低い傾向が認められた。

以上のように，感染性推定遺伝子検査法を用いることにより，ノロウイルスの生存性に関する新しい知見が数多く得ることができた。今後も，同様のデータを蓄積して行きたい。

カキ等の食品や下水等の環境中のウイルスを対象とした感染性推定遺伝子検査法の確立およびそれを応用した食品等のウイルス汚染リスクの正確な把握を目的として，開発法および従来法を用いて，カキ，下水等からのノロウイルスの検出を実施した。

平成24年度は平成24年度暫定試験法および従来法を用いて実施した。実際の食品等の汚染実態調査への応用に先立ち，試験機関ごとに開発法と従来法で得られる遺伝子定量値の相対比(従来法に対する開発法の定量値の比)を新鮮な患者糞便を対象として調べた。開発

法では従来法と比較して，やや低く定量値される傾向にあるが，食品等の検出に十分適応できるものであった。市販カキ等のノロウイルス定量値を開発法と従来法で比較した結果，相対比を考慮した上で，開発法で得られる定量値が低い傾向にあり，カキには不活化されたノロウイルスが存在している可能性が示唆された。また，下水流入水と比較して下水放流水の定量値は，開発法で得られる定量値がより低下する傾向にあり，下水放流水により多くの不活化されたノロウイルスが存在している可能性が示唆された。

平成 25 年度は,内部コントロールとしてネコカリシウイルスを添加する試験法に改良した平成 25 年度暫定試験法および対照試験を用いて実施した。その結果，平成 24 年度の結果と同様に，カキには不活化されたノロウイルスが存在している可能性が示唆されるとともに，下水流入水と比較して下水放流水の定量値は，開発法で得られる定量値がより低下する傾向にあり，下水放流水により多くの不活化されたノロウイルスが存在している可能性が示唆された。それらの結果は，検査機関あるいは下水処理場によって違いが認められるものの，全体的な傾向として明確に観察することができた。一方，ネコカリシウイルスは，下水放流水中および海水中での生存性が低いことが判明し，それらの試験においては内部コントロールとしては適さないことが明らかになった。今後はそれらの試験においては，ネコカリシウイルス以外のウイルスを内部コントロールとする必要があると考えられる。一方，カキへの添加ではネコカリシウイルスは概ね安定であったが，一部の検体においては異常値（開発法の定量値が高くなる）がみられることもあった。今後その原因についても明らかにする必要がある。

いずれにしろ，感染性推定遺伝子検査法をカキや下水のノロウイルスの検出に用いることにより，従来法と比較して非感染性ウイルスの排除が可能であると考えられる。

一方，IgG結合カラム吸収法やパンソルビン処理法について，糞便中の抗体被覆粒子/非被覆粒子の鑑別を行った。IgG結合カラム吸収法については十分な検体について検討を行うことができた。その結果，ノロウイルス-IgG複合体を含む分画は，有意差は認められなかったものの発症者と不顕性感染者の測定値の分布が近く，totalな量に占める割合は発症者14.5%，不顕性感染者17.9%と不顕性感染者群の方が高い割合を示した。一方，共通食の喫食後ノロウイルスでは3日後，サポウイルスでは5日後にはウイルス-抗体複合体が検出されたことから，らそれまでに獲得していた抗体誘導性に加え，何らかの抗体の非特異的な結合の可能性も考えられた。今後，その点を明確にする必要がある。

パンソルビン吸収法は開発に時間が必要であったことから，今回の研究では実際の検体について十分な検討を行うことができなかった。しかし，再感染が疑われる患者では抗体被覆粒子の存在比が高くなることや，小児より大人においては抗体被覆粒子の存在比が高くなる傾向が観察された。今後例数を増やして検討する必要がある。

また，IgG結合カラム吸収法とパンソルビン吸収法による比較も実施する必要がある。

A 型肝炎ウイルスの 3 つの遺伝子型について，60℃で加熱処理を行い，ウイルスの感染性がどれだけ減少するかについて調べた。その結果，1 時間の処理ではあまり感染価の減少が見られず，感染価を 1/1000 以下に減少させるには 10 時間程度の処理が必要であることがわかった。

G1 E 型肝炎ウイルス様粒子(G1 E 型肝炎ウイルス-LPs)をそれぞれウサギとモルモットの大腿筋肉に接種し，高力価な抗 E 型肝炎ウイルス抗体を作製した。ウサギ抗 E 型肝炎ウイルス抗体の抗体価は $5X10^6$，モルモット抗 E 型肝炎ウイルス抗体の抗体価は $4X10^5$であった。これらの抗体を用いて E 型肝炎ウイルス抗原検出 ELISA 法を樹立した。

PLC/PRF/5 細胞で増殖した E 型肝炎ウイルスを種々の条件化で加熱処理した後，PLC/PRF/5 細胞に接種した。経時的に培養上清中のウイルス抗原を ELISA 法で測定し，E 型肝炎ウイルスの増殖の有無により，ウイルスを失活させる温度を見いだした

2) 結論

感染性推定遺伝子検査法を開発した。開発した感染性推定遺伝子検査法は，従来の検査法と比較して，より感染性ウイルス量を反映した。

ノロウイルスの生存性は液体中および乾燥状態のいずれでも，清浄環境より汚染環境で高くなる傾向があった。

ノロウイルスの海水中での生存性は夏季より冬期において高くなる傾向があった。

カキには非感染性粒子が含まれていること，また下水放流水には下水流入水と比較して，非感染性粒子がより多く含まれていることが示唆された。

ノロウイルスの生存性は乾燥状態および液体中でも汚染環境において高いと考えられた。また，海水中における生存性は夏季より冬期に高くなると考えられた。

ネコカリシウイルスの生存性は，不活化の種類や環境の違いによって，必ずしもノロウイルスと同様の傾向を示さなかった。

抗体被覆ウイルス鑑別法として，プロテイン A カラム処理法およびパンソルビン処理法の 2 法を開発した。それらを用いて，糞便中には抗体被覆粒子が存在することが示された。また，その抗体被覆粒子の占有割合は，発症者と非発症者，初感染と再感染において違う可能性が示唆された。

A 型肝炎ウイルス，E 型肝炎ウイルスの不活化条件を調べ，リスクプロファイルに有用なデータを蓄積した。

図1　不活化ウイルスの作製法

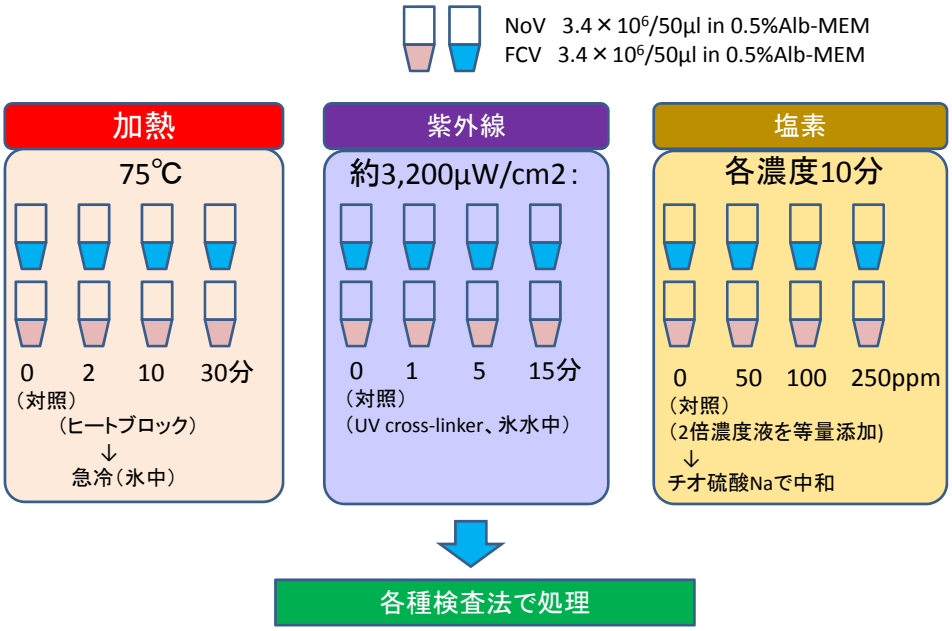
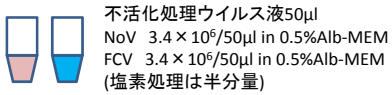


図2　各種検査法のプロトコル



報告	未処理	Kimら	Nuanualsuwanら	*Lamhoujebら*	Toppingら
原理		EMB処理	PKとRNaseの同時処理	PK処理後RNase処理	RNaseOne処理
方法	4℃放置 ↓ PBSを20μl加える ↓ RNA抽出	EMA溶液2μlを加える。 ↓氷中、30min （遮光） ↓ タカラLED linkerで20～30min照射 ↓ PBSを18μl加える ↓ RNA抽出	PK(30U/μl)、RNase（2μl)を加える ↓ 37℃、30min ↓ RNase inhibitor (40U/μl) 1μlを加える ↓ PBSを16.25μl加える	PK(30U/μl)を0.75μlを加える ↓37℃、1h 200μM PMSFを2μl加える ↓室温、30min RNase（50ng/μl) 2μlを加える ↓ RNase inhibitor (40U/μl) 1μlを加える ↓ PBSを14.25μl加える ↓ RNA抽出	RNaseOne 1μl、10×reaction buffer 6.67μlを加える ↓ 37℃、15min ↓ PBS 13.3μlを加える ↓ RNA抽出

RNA抽出へ

図3　RNA抽出、逆転写反応、リアルタイムPCR

RNA抽出

処理検体70μl
↓
QIAGEN QIAamp Viral RNA Mini Kit
↓
AVE60μlに溶出

逆転写反応

抽出RNA25μl(50μlの系)
↓
25℃:10分⇒37℃:1hr⇒85℃:5分

リアルタイムPCR

鋳型DNA2.5μl(25μlの系)
↓
50℃:2分⇒95℃:10分⇒(95℃:15秒⇒56℃:1分)×50回

逆転写反応液組成

抽出RNA	25μl	
10×RT　buffer	5μl	ABI(High capacity cDNA Reverse Transcription Kit)
25×dNTPs(100mM)	2μl	
10×Random primer	5μl	
MultiScribe RTase	2.5μl	
Oligo dT primer	0.5μl	invitrogen
DW	10μl	

GII NoV real-time PCR

cDNA	2.5μl
COG2F(100μM)	0.1μl
COG2R(100μM)	0.1μl
ALPF(100μM)	0.1μl
RINGAL-TP(100μM)	0.06μl
DW	9.64μl
Taqman Universal MM	15μl

FCV real-time PCR

cDNA	2.5μl
FCV(+)7487(100μM)	0.1μl
FCV(-)7609(100μM)	0.1μl
FCV-7552-7571(100μM)	0.05μl
DW	9.75μl
Taqman Universal MM	15μl

(NIHS-U法)

(Kageyamaらの方法の変法、通知法)

表1　遺伝子検査による感染性ウイルス粒子検出法

No	区分	原理	文献
1	培養細胞への結合性を利用	培養細胞に結合する能力を持つウイルス粒子のみを検出	Reynolds(2004) Schlindwein(2010)
2	蛋白分解酵素とRNase処理の併用	蛋白分解酵素感受性粒子中のウイルスRNAをRNase処理し排除	Nuanualsuwan(2002) Lamhoujeb (2008)
3	RNase処理	ウイルス構成蛋白質の変性・破壊等に伴い、内部あるいは露出したRNAを分解。	Topping(2008)
4	エチジウム・モノアザイド(EMA)処理	ウイルス構成蛋白質が変性・破壊等に伴い、内部あるいは露出した遺伝子に結合し、PCR反応を阻害	Kim(2011)
5	プロピジウム・モノアザイド(PMA)処理	ウイルス構成蛋白質が変性・破壊等に伴い、内部あるいは露出した遺伝子に結合し、PCR反応を阻害	Fittipaldi(2010)

図4-1　感染性粒子推定検出法の比較(対数表示)
（加熱、75℃）

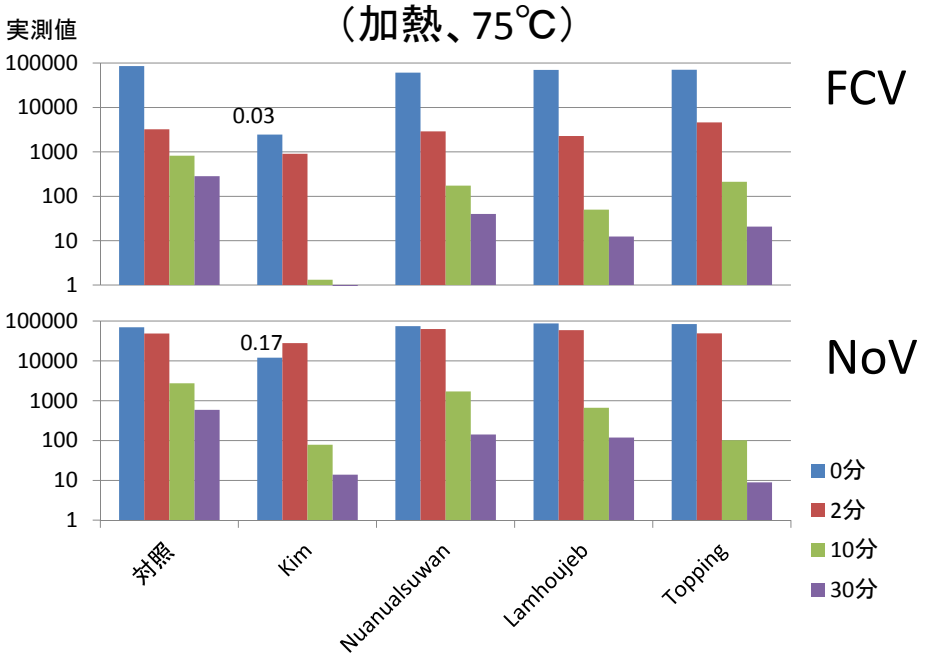


図4-2　感染性粒子推定検出法の比較(実数表示)
（加熱、75℃）

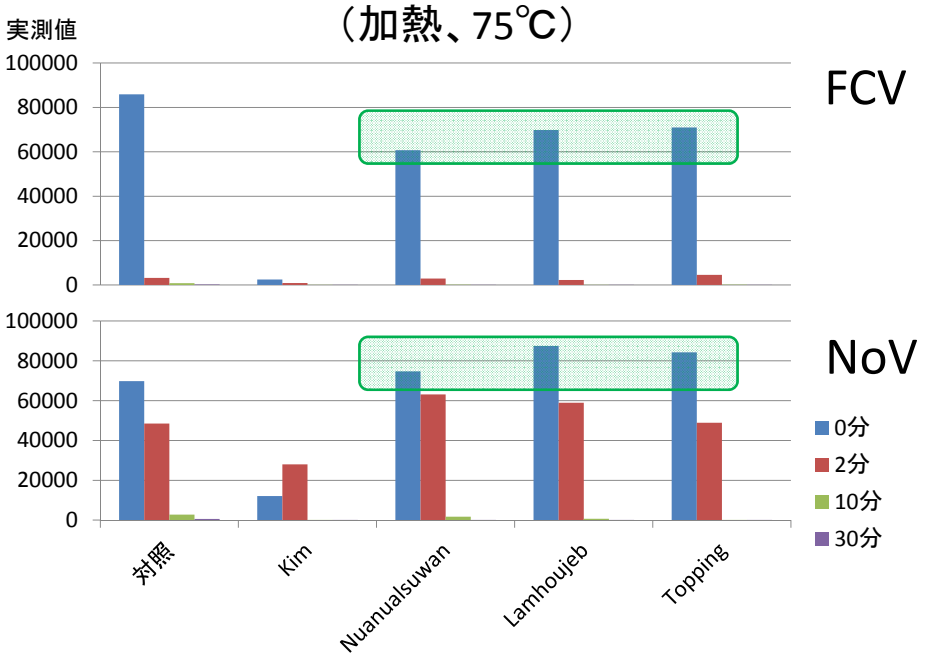


図4-3　感染性粒子推定検出法の比較(対数表示)
（紫外線、約3,200μW/cm²）

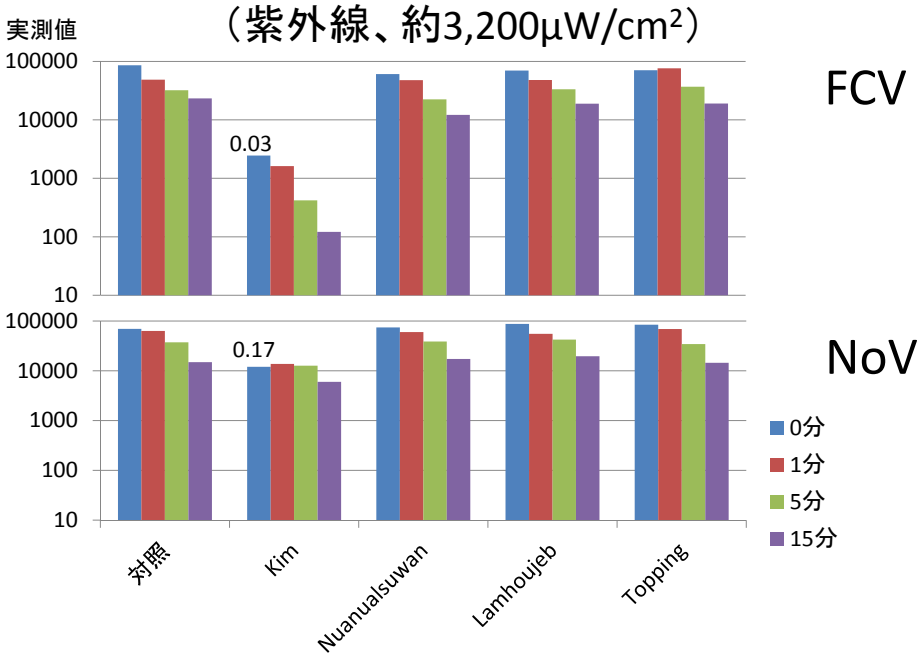


図4-4　感染性粒子推定検出法の比較(実数表示)
（紫外線、約3,200μW/cm²）

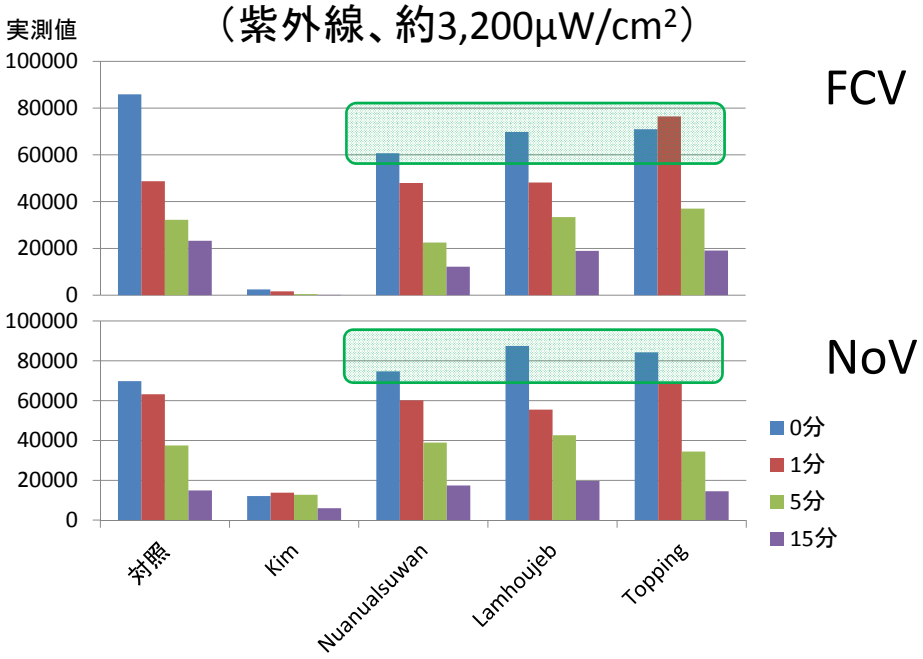


図4-5　感染性粒子推定検出法の比較(対数表示)
（塩素、10分）

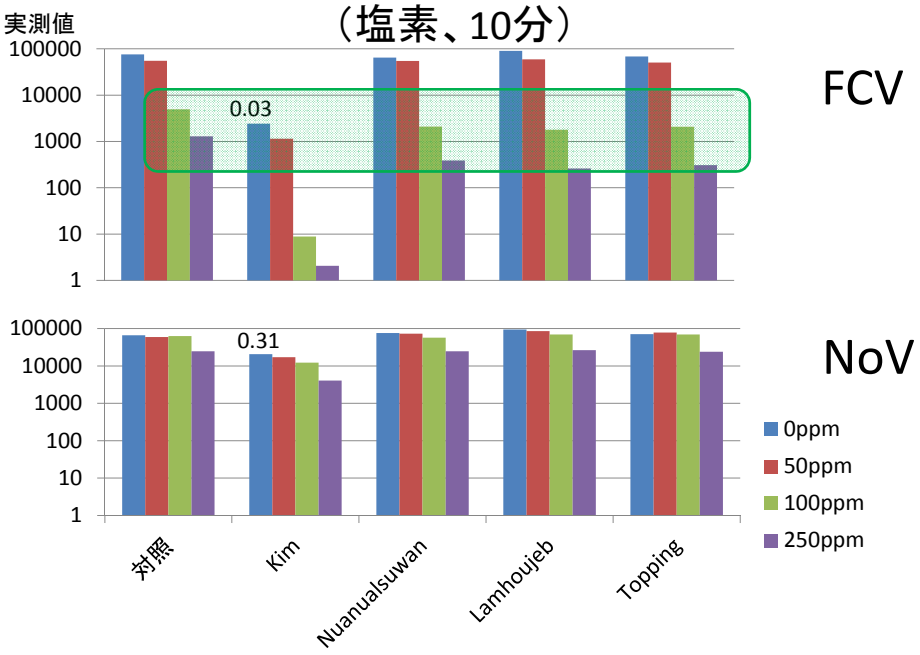


図4-6　感染性粒子推定検出法の比較(実数表示)
（塩素、10分）

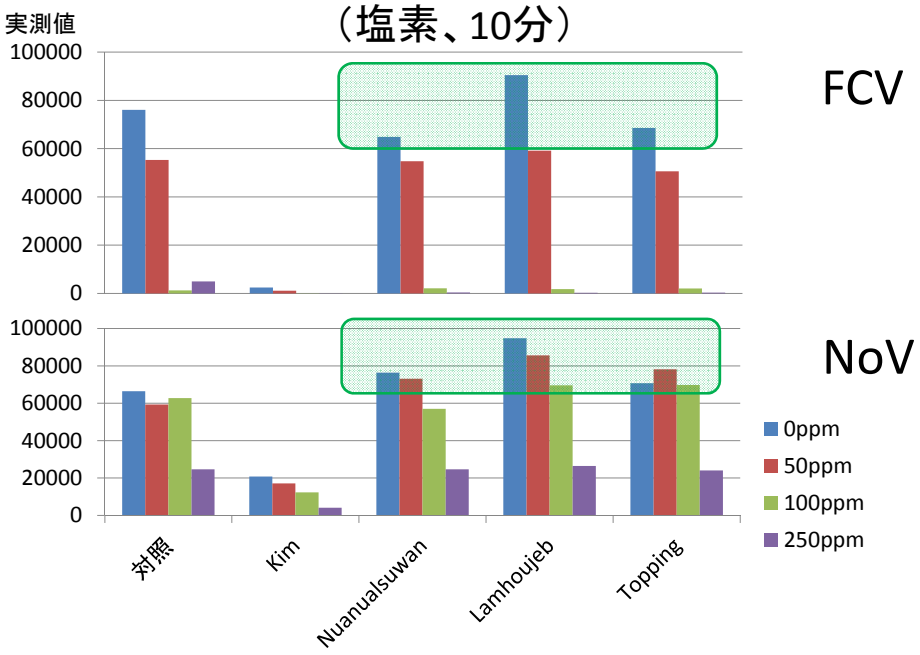


図5-1　未処理(従来法)に対する相対定量値

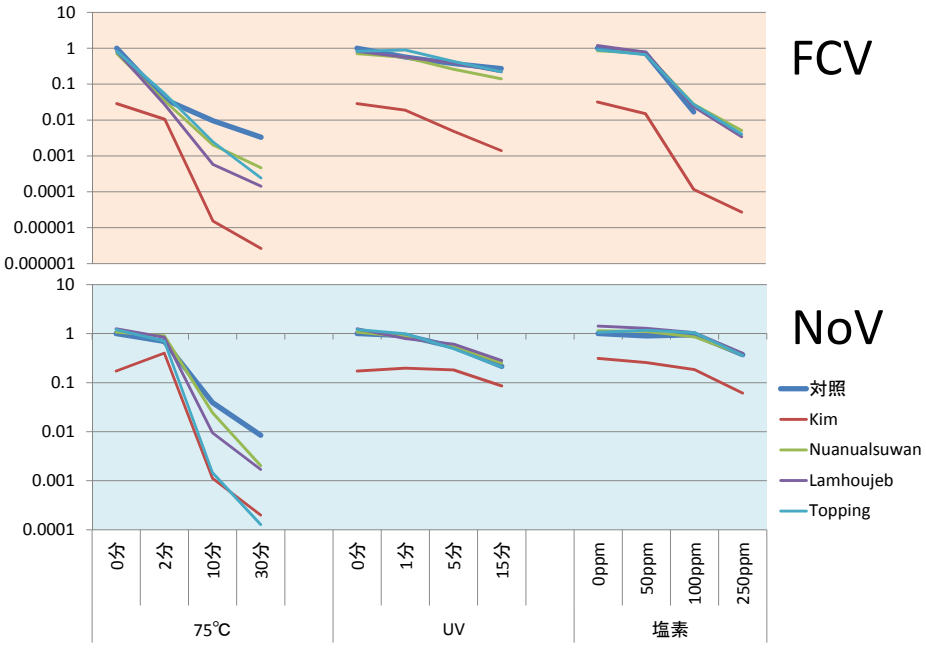


図5-2　未処理(各方法ごと)に対する相対定量値

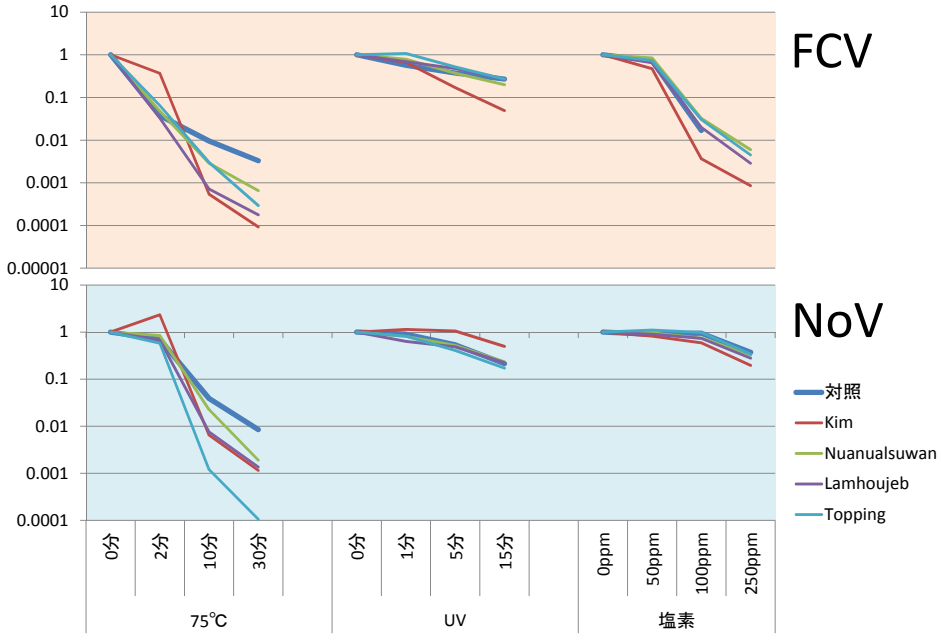
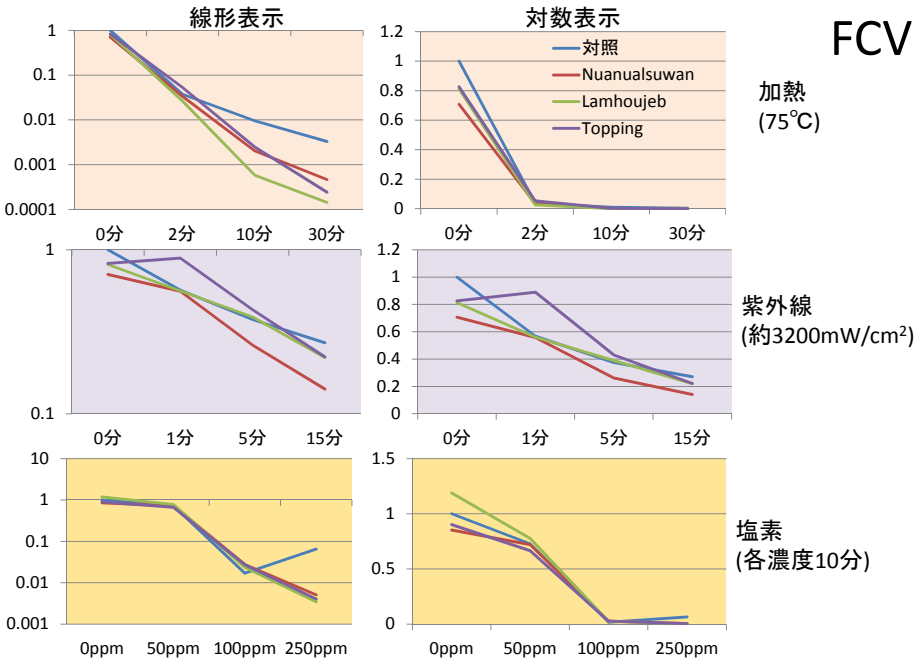


図6-1　未処理(従来法)に対する相対定量値



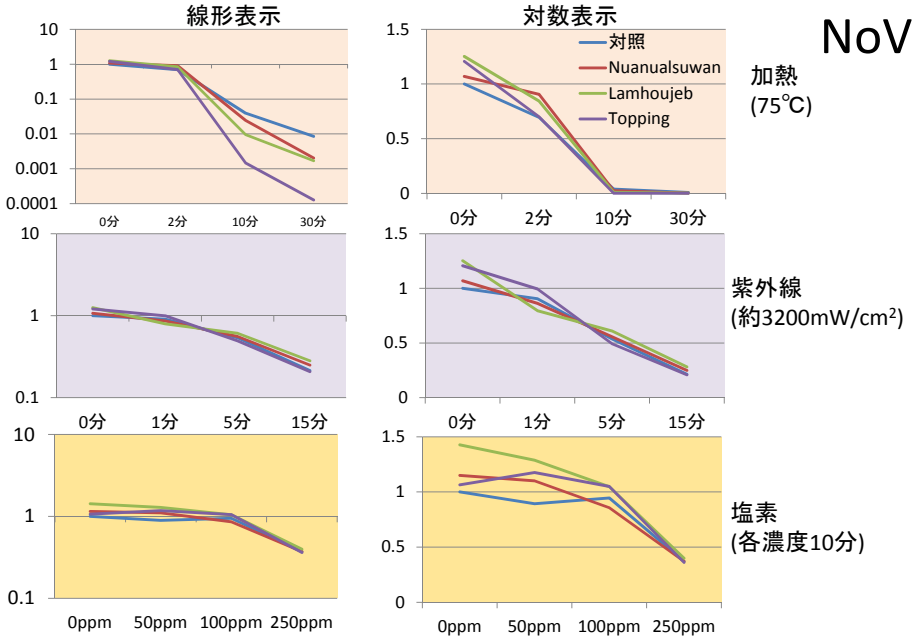
FCV

加熱
(75℃)

紫外線
(約3200mW/cm²)

塩素
(各濃度10分)

図6-2　未処理(従来法)に対する相対定量値



NoV

加熱
(75℃)

紫外線
(約3200mW/cm²)

塩素
(各濃度10分)

図7　検出法の改良-1（Oligo dT　primerによる逆転写反応）

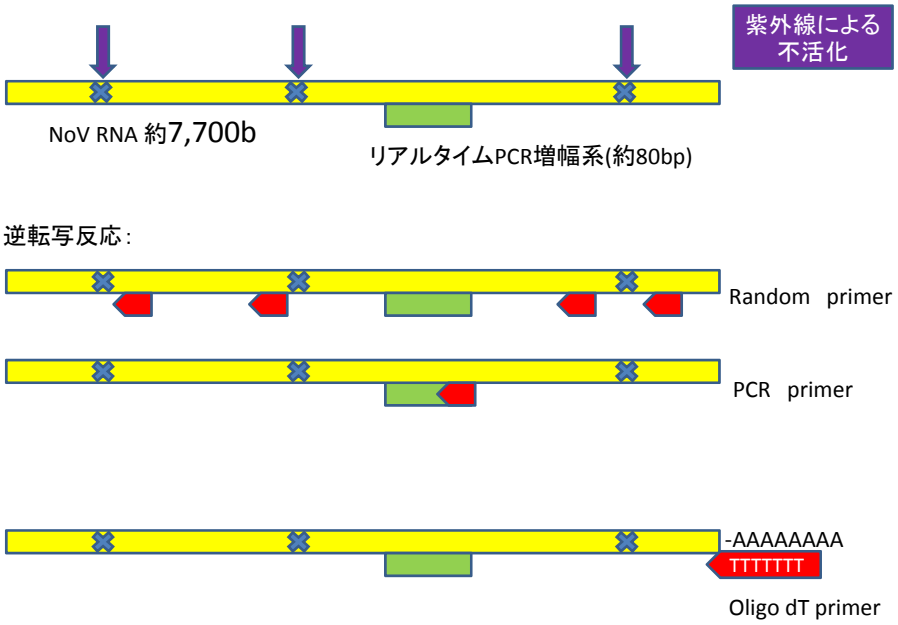


図8　Random　primerとOligo dT　primerによる FCV、NoVの定量値

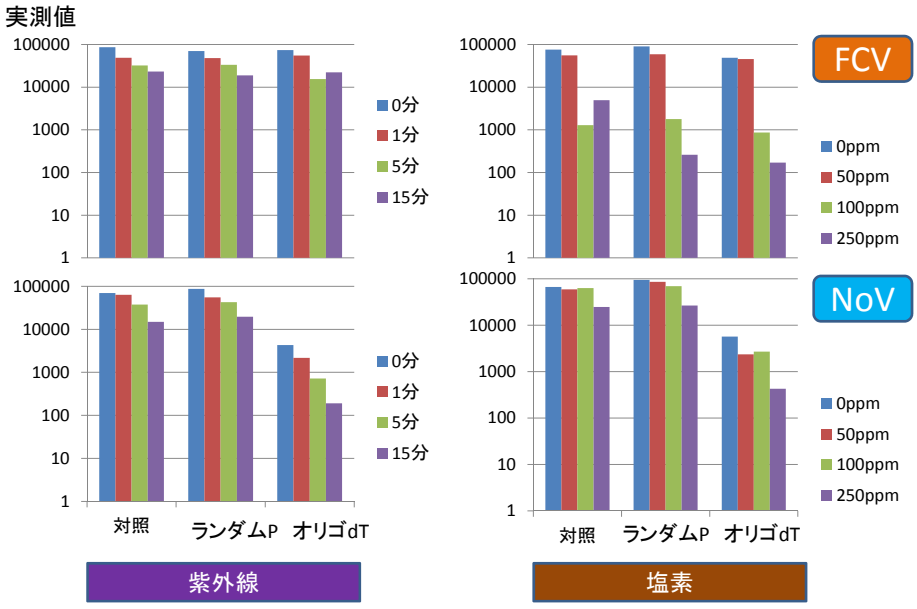


図9　リアルタイムPCR増幅系の位置と逆転写プライマーによる定量値の変動

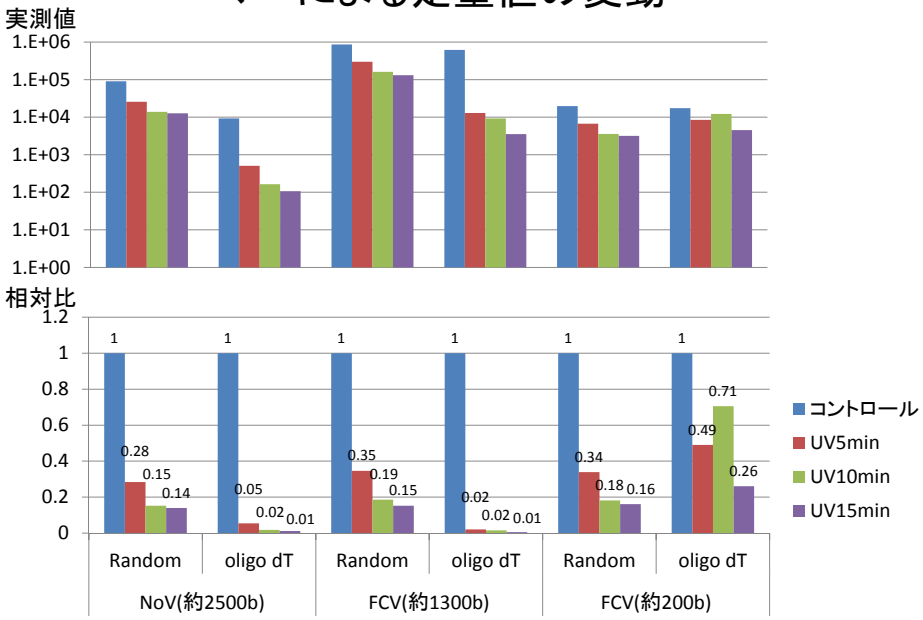
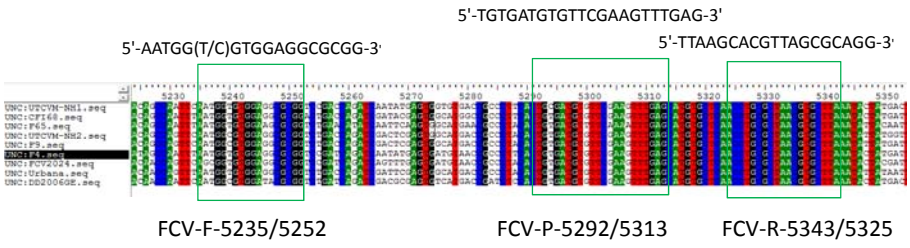


図10　FCV ORF1/2領域リアルタイムPCR増幅系

ウイルス		ゲノム全長	F側	R側	増幅産物の長さ	ゲノム全長に対する割合	3'からF側の距離	ゲノム全長に対する割合	報告者
GI NoV	GI/1	7654	5291	5375	85	1.1%	2364	30.9%	Kageyama
GII NoV	GII/4	7555	5003	5100	98	1.3%	2553	33.8%	Kageyama
FCV		7691	6319	6440	122	1.6%	1373	17.9%	山本ら
		7691	7487	7609	123	1.6%	205	2.7%	NIHS-U
		7691	5235	5343	109	1.4%	2457	31.9%	NIHS-N



増幅産物　5235-5343（109bp）

図11　PCR増幅部位におけるOligo dTプライマーによる逆転写反応の影響(前処理、RNaseOne(+PK))

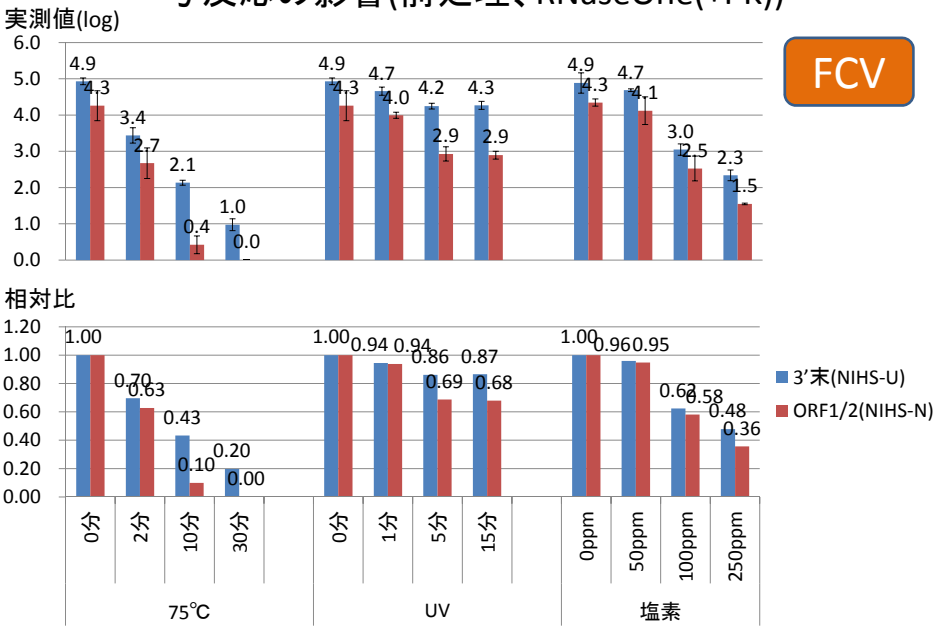


図12-1　RNA抽出時のt-RNAの濃度および逆転写反応時間の影響

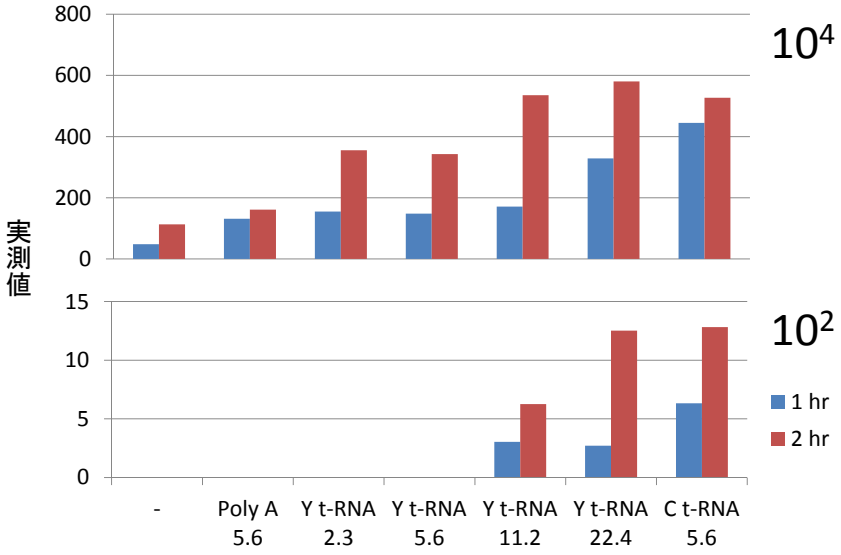


図12-2　RNA抽出時のtRNAの濃度および
逆転写反応時間の影響

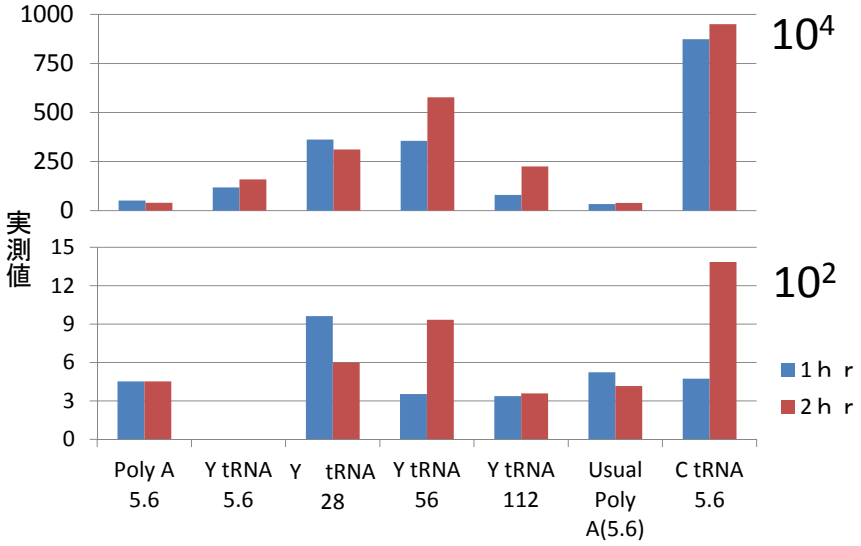


図12-3　RNA抽出時のtRNAの濃度の影響(3)

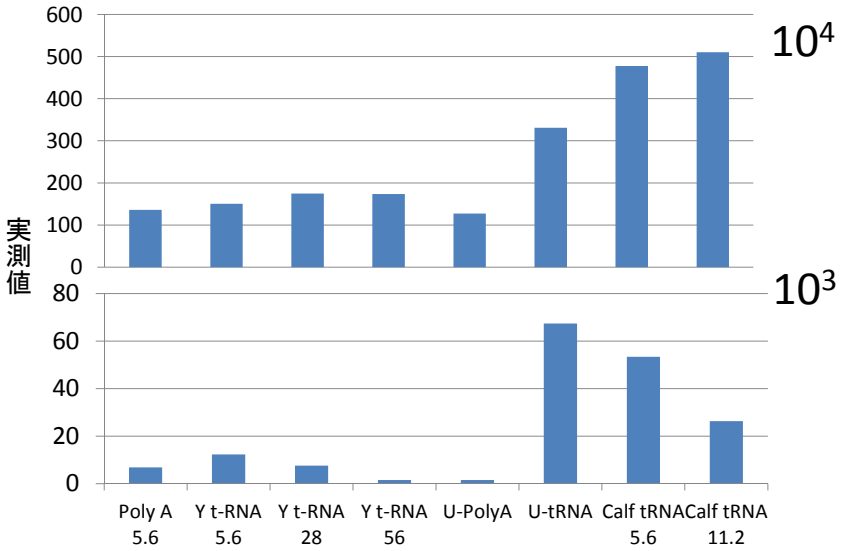


図13 逆転写酵素の比較

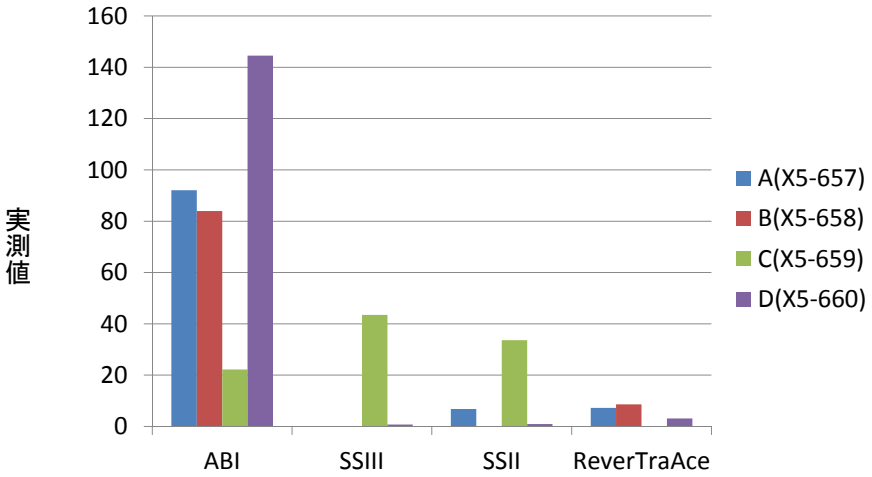
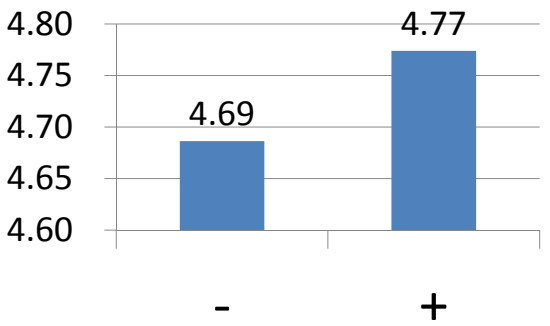


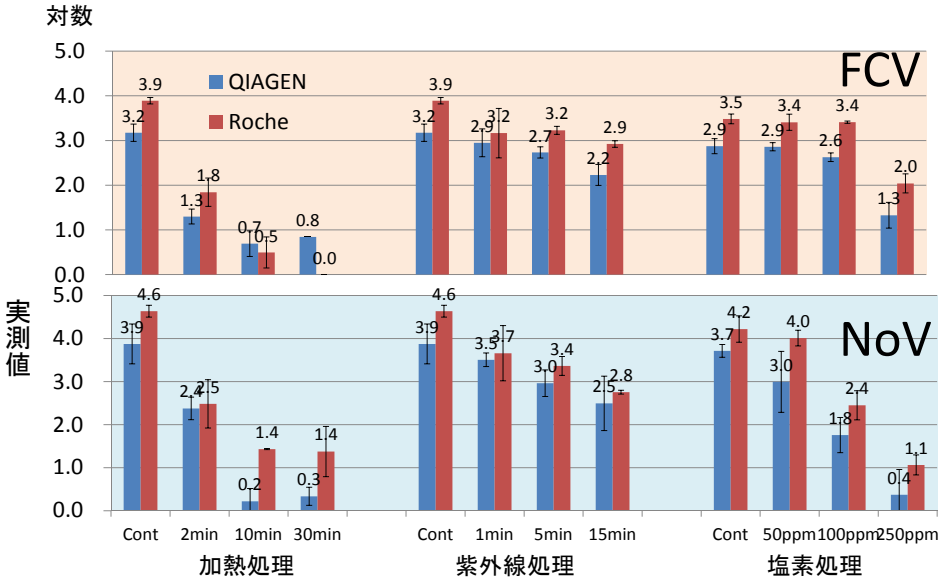
図14 RTmateの有無による定量値の変化



N=6の対数変換値の平均値

RTmate添加により定量値は増加するが、特に顕著ではなく、また試薬代が高いので原則採用せず。
ただし、食品や下水等野外の試料の場合有用である可能性がある。
RocheのキャリアRNA(MSファージ)など、安価な試薬の代替え品の検討も必要

図15 RNA抽出キットの比較



QIAGEN:QIAamp Viral RNA mini kit, Roche: High Pure Viral RNA kit
70μlの材料から抽出⇒60μlの溶出液に回収(tRNAをキャリアRNAとして使用)

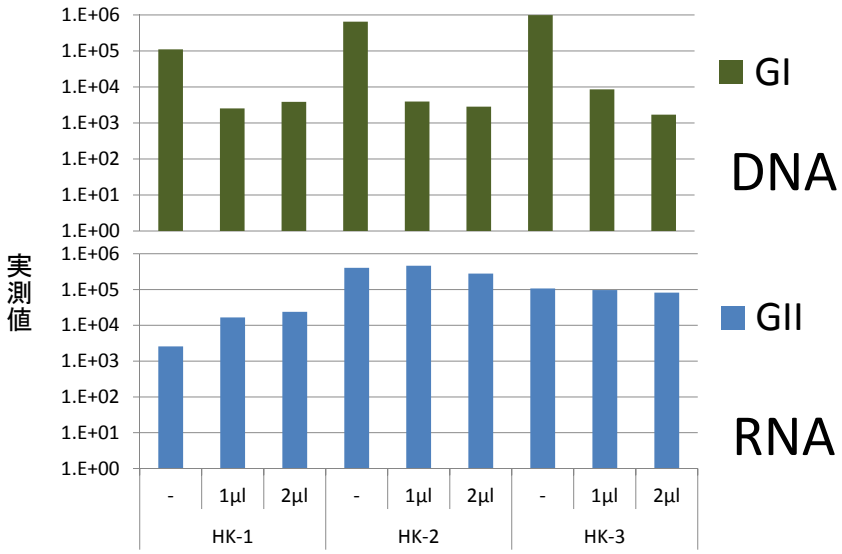
図16 オンカラムDNase処理(Rocheキット)

検体200μlにBinding buffer 400μlを加え、混和
↓
カラムにセット
↓
遠心(8000×g:15sec)
↓
Inhibition removal Buffer 500μlを加える
↓
遠心(8000×g:1min)
↓
Washing buffer 450μlを加える
↓
遠心(8000×g:1min)　　2回繰り返し
↓
遠心(Max:10sec)
↓
Elution buffer 50μlを加える
↓
遠心(8000×g:1min)
↓
溶出液:精製RNA

DNase処理
(室温で、15～20分放置)

試薬	量
X10 reaction buffer	10μl
DW	89μl
DNaseI	1μl

図17　オンカラムDNase処理



GIIのウイルス粒子にGIのDNAを添加して、Dnase処理を実施。-は処理なし。HK-1～3は検体番号

表2　暫定法の改良(高感度化)のまとめ

工程	改良	備考
RNA抽出	キャリアRNAとしてPolyAの替りにtRNA(特に、Calf tRNA)を使用 キットをQIAGENからRocheに変更	Oligo dTによるRT反応阻害の軽減
DNase処理	オンカラム(RNA抽出時)DNase処理の導入	加熱、バッファ添加による定量値低下の解消
逆転写反応	ABIキットを使用 反応時間は2時間 （Rtmateの添加）	高感度化

図18 PK処理の有無の比較

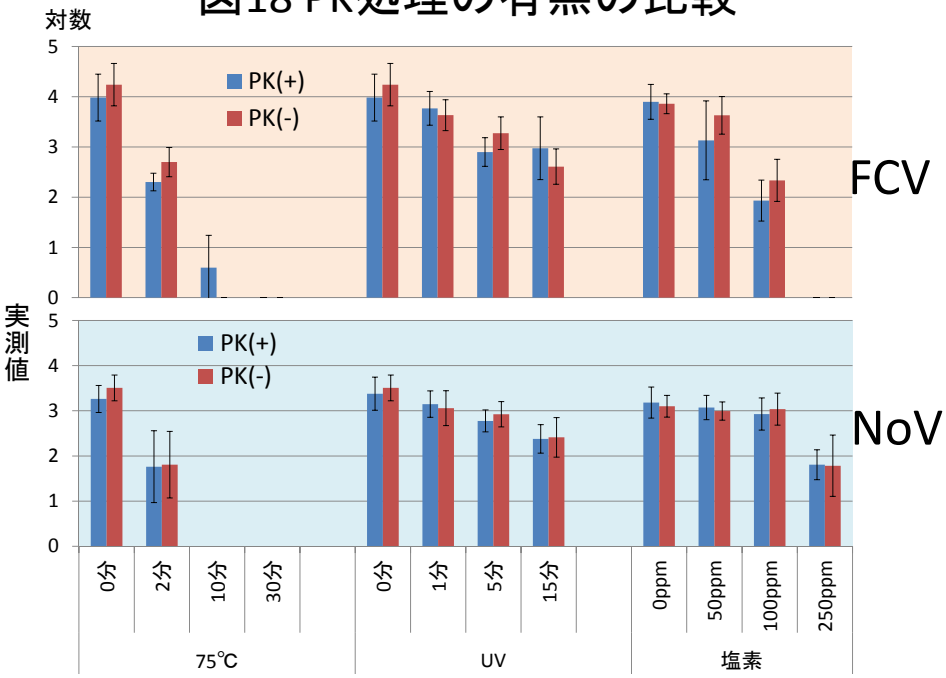


図19-1　開発法と未処理の比較（加熱、75℃）

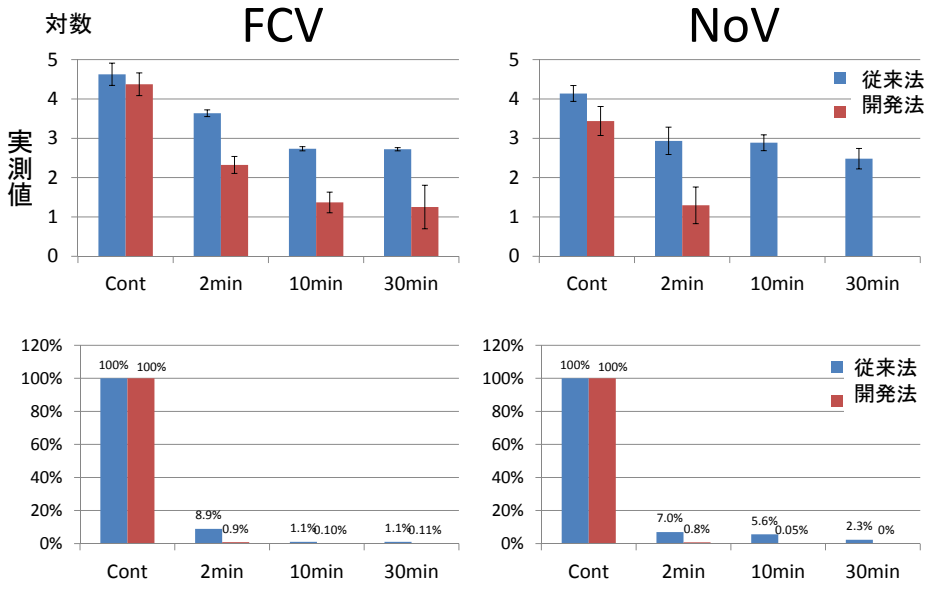


図19-2　開発法と未処理の比較
（紫外線、約3,200μW/cm2）

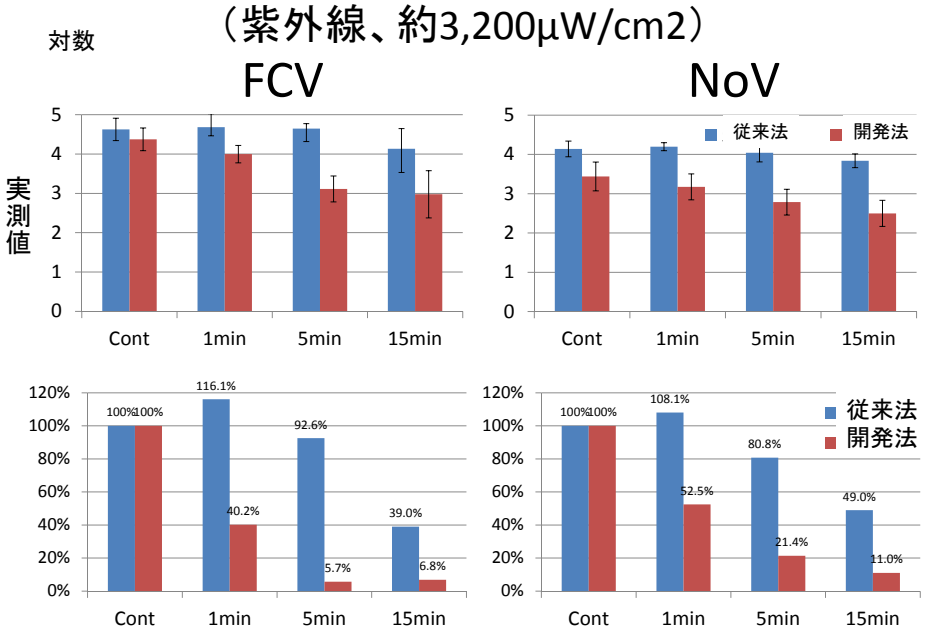


図19-3　開発法と未処理の比較（塩素、10分）

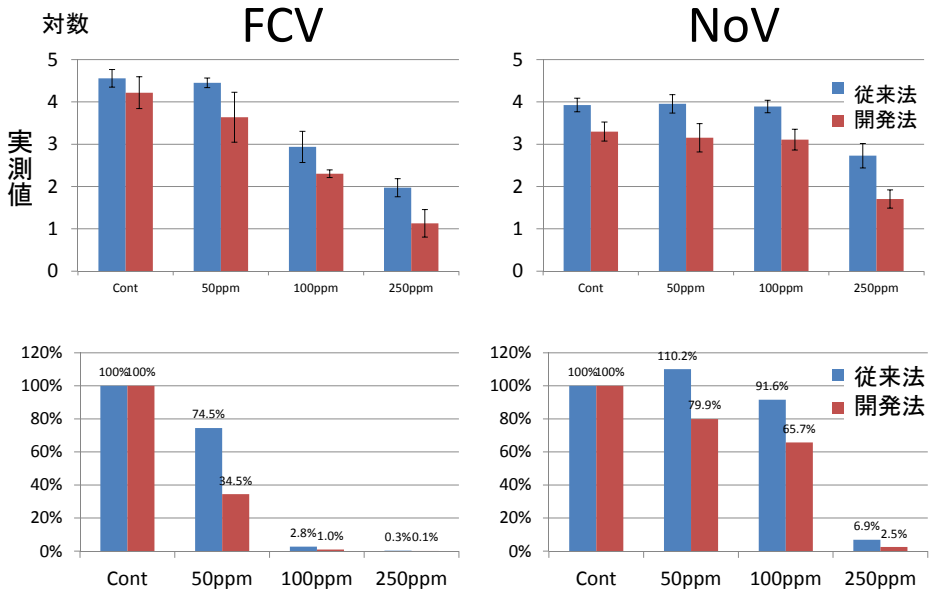


図20　添加用ウイルスの定量値からNoVの定量値を推定

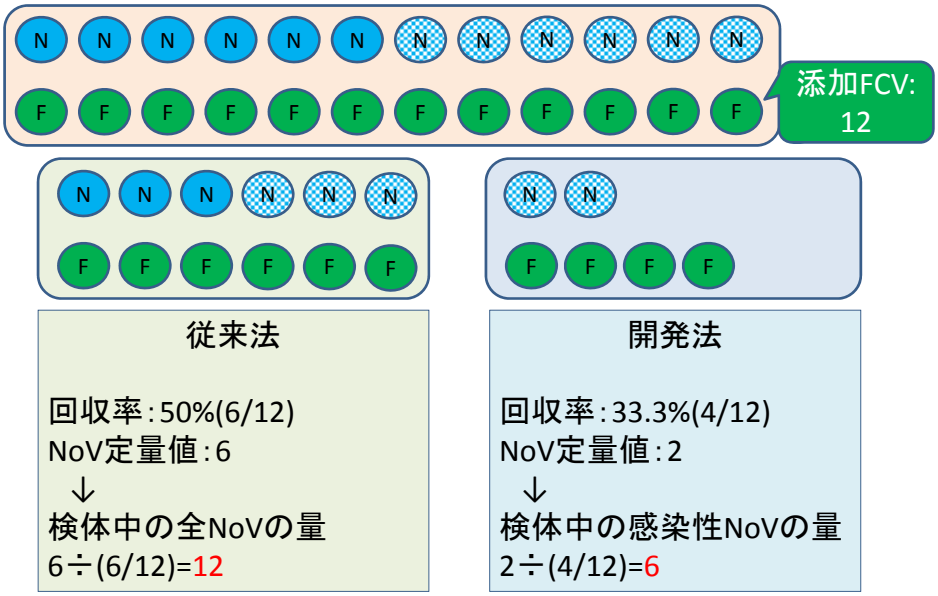


図21　FCV添加のGII定量値に対する影響

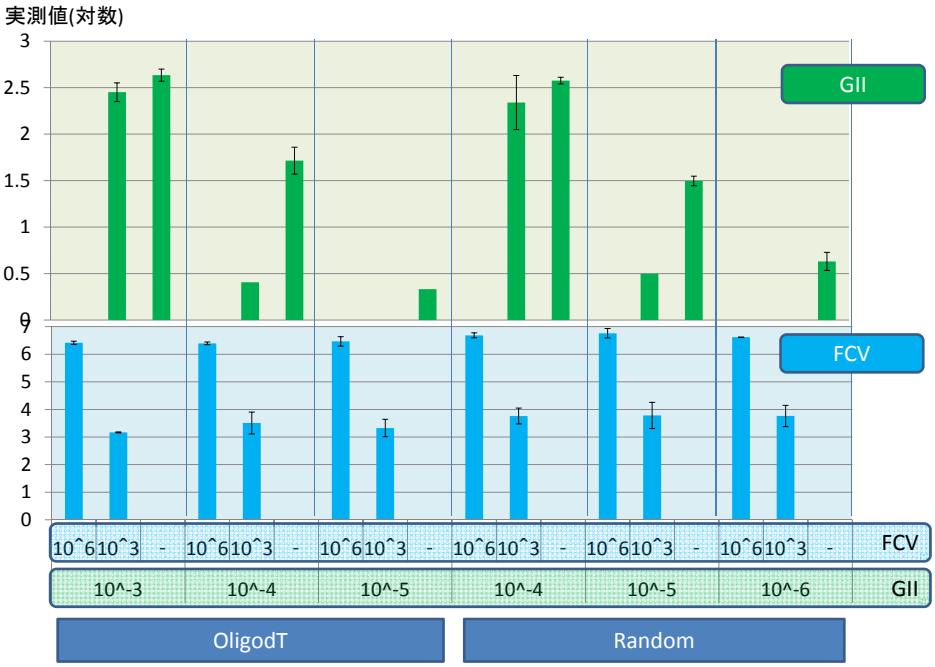


図22　FCV添加のGII定量値に対する影響

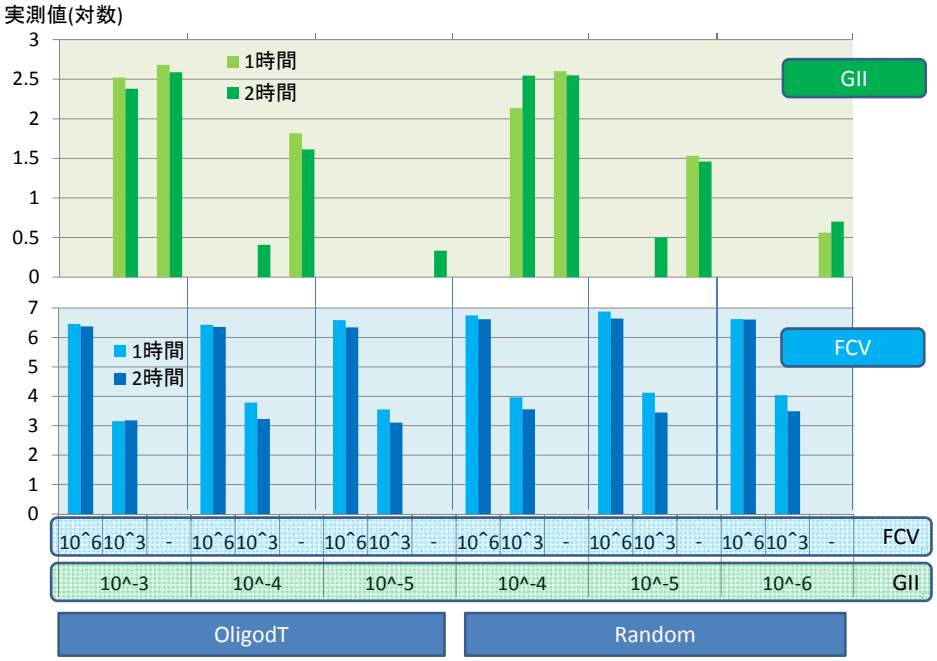


図23　逆転写酵素による比較

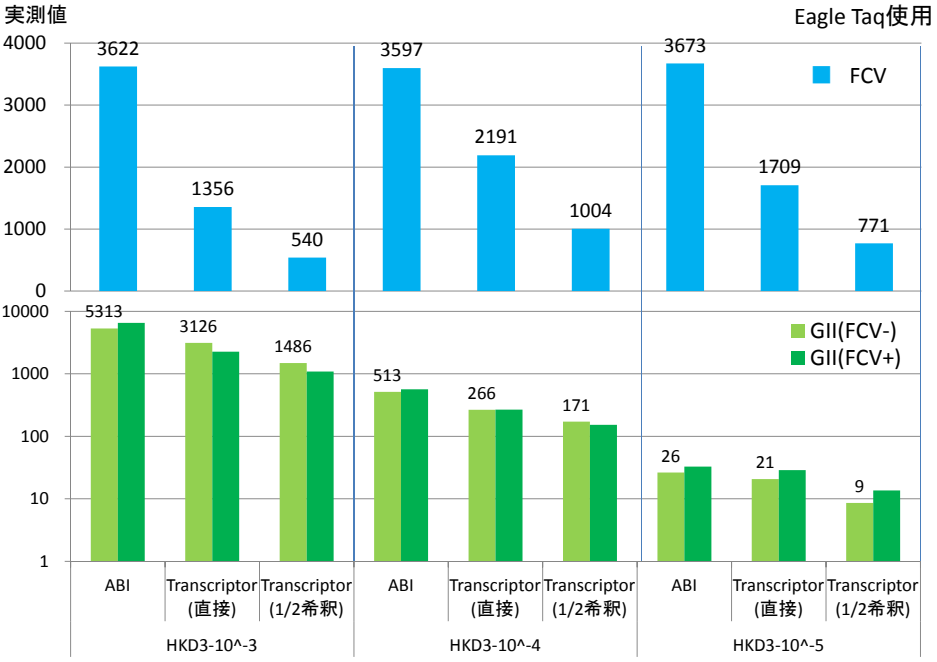


図24　リアルタイムPCRマスターミックスによる違い

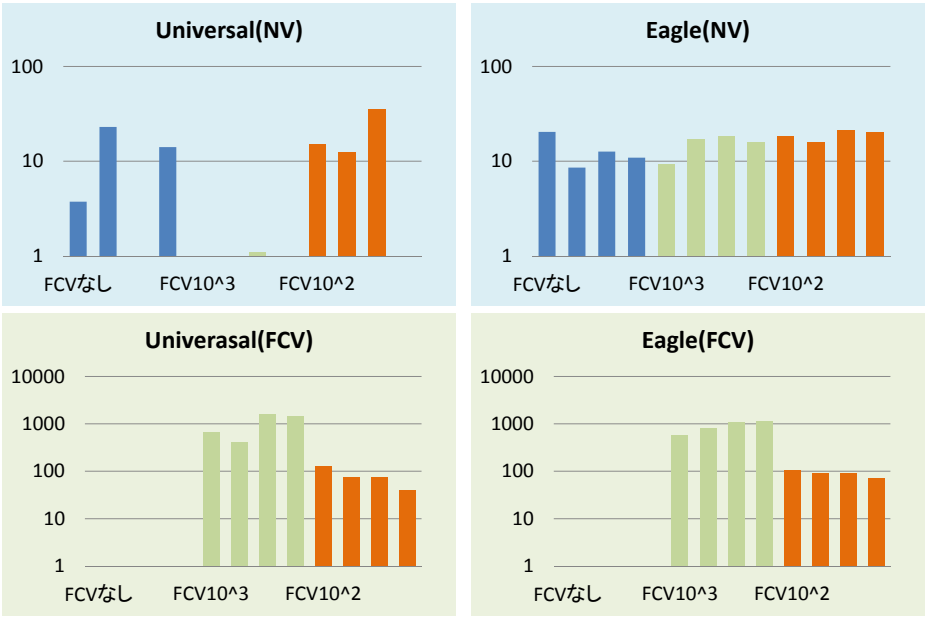


図25　添加FCV量別の市販カキのNoV GIIの定量値(実測値)の影響
(N=7, いずれかの方法で陽性となった検体)

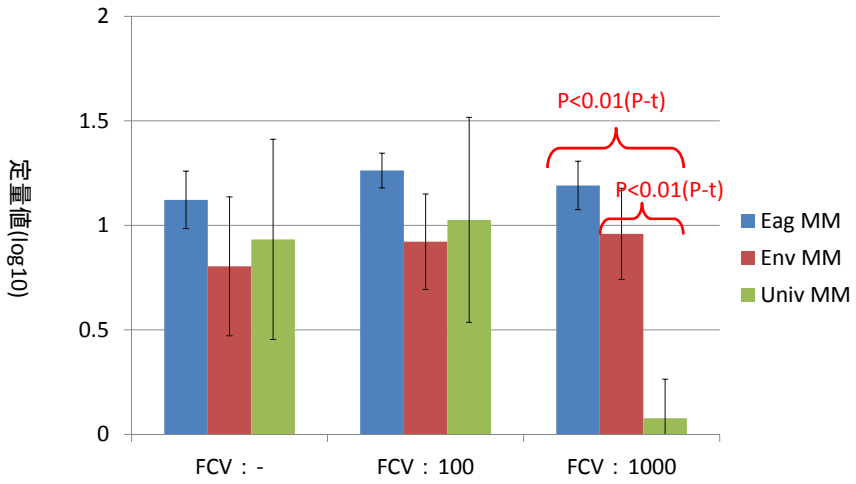


図26　マスターミックス別の市販カキのNoV GIIの定量値(実測値)の影響(N=7, いずれかの方法で陽性となった検体)

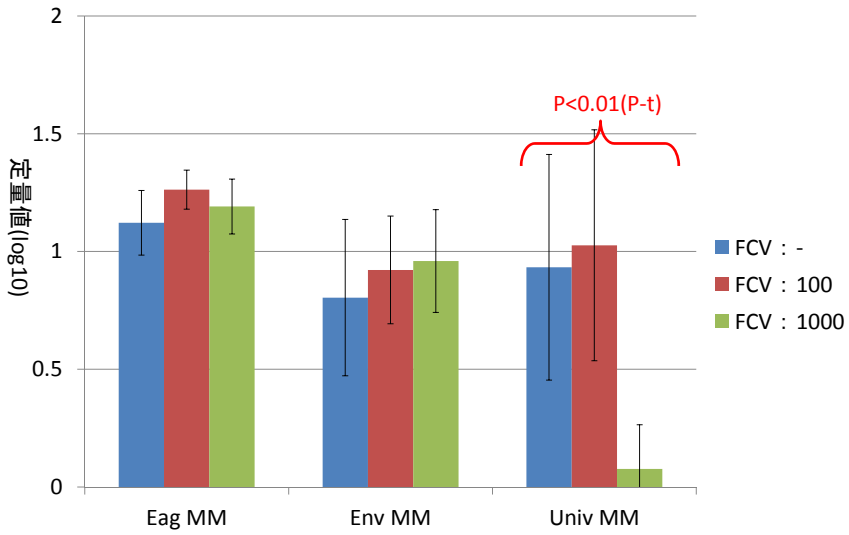


図27　カキに添加したFCV(10^2)のマスターミックス別の定量値(実測値)の比較(N=12)

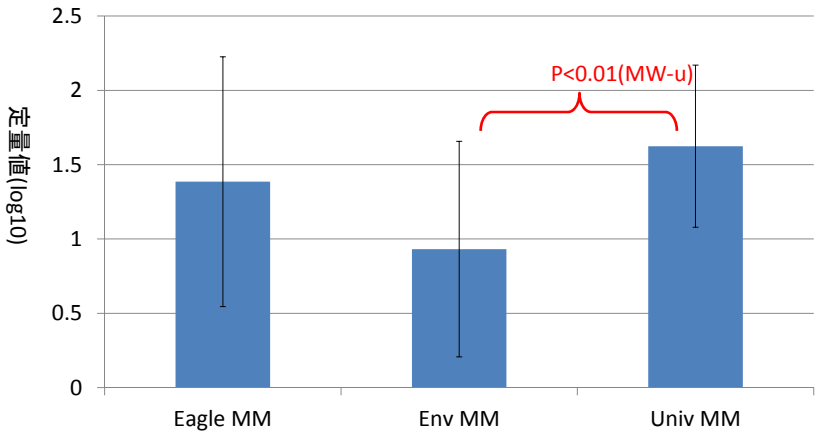


図28　カキに添加したFCV(10^3)のマスターミックス別の定量値(実測値)の比較(N=12)

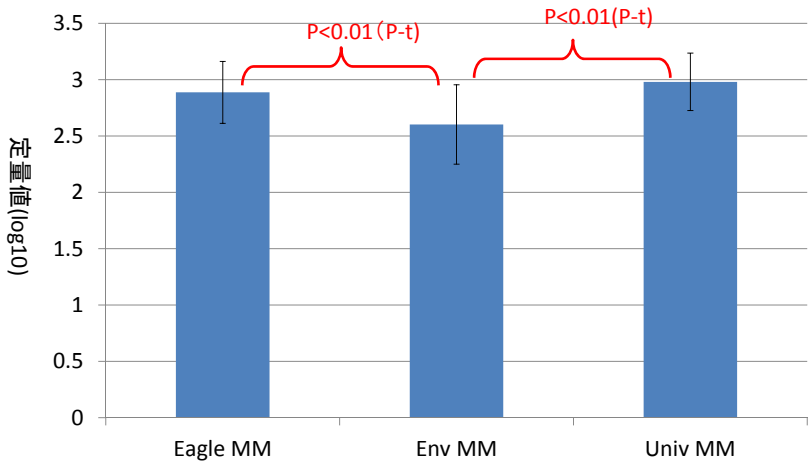
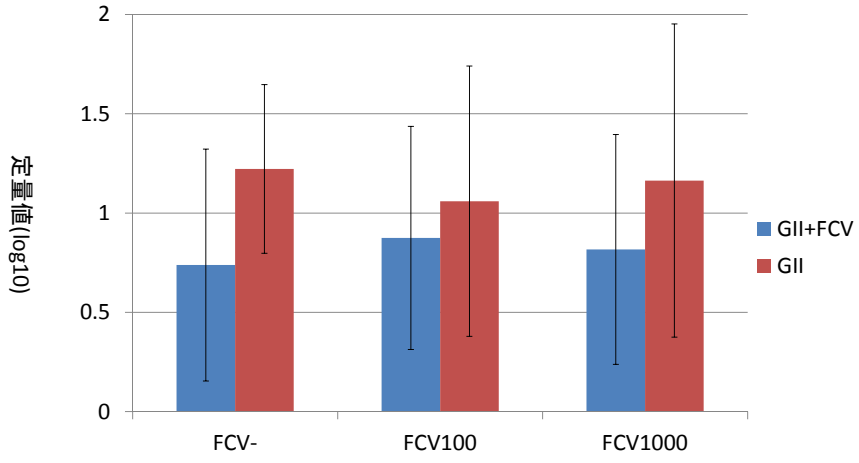
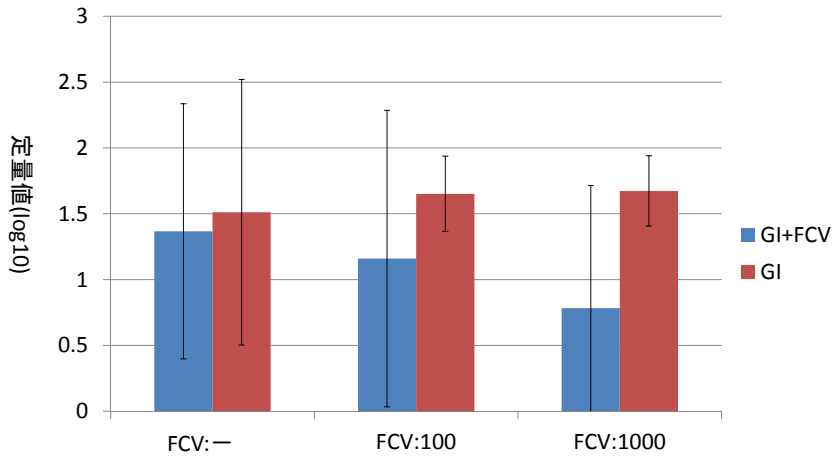


図29　GII+FCVとGII単独別の市販カキのNoV GII定量値(実測値)の影響 (N=5, いずれかの方法で陽性となったカキ検体)



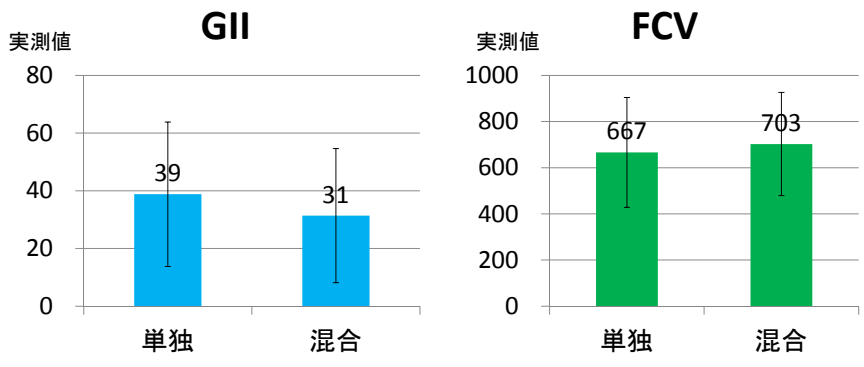
マスターミックス：Eagle taq MM with Rox

図30　GI+FCVとGI単独別の市販カキのNoV GI定量値(実測値)の影響 (N=5, いずれかの方法で陽性となったカキ検体)



マスターミックス：Eagle taq MM with Rox

図31　GIIとFCVの検出におけるsingle PCRとduplex PCRの比較



	GII		FCV	
	単独	混合	単独	混合
平均	39	31	667	703
SD	25	23	238	224

GII 陽性市販カキ(N=12) Eagle taq with ROX

図32　パンソルビンのランダムPとオリゴdTPによる逆転写反応への影響

FCV添加カキ濃縮材料にパンソルビン（対照：PBS)を添加⇒RNA抽出⇒ランダムプライマーとオリゴdTプライマーで逆転写⇒定量(N=2)
⇒パンソルビンの添加による定量値の減少率を比較

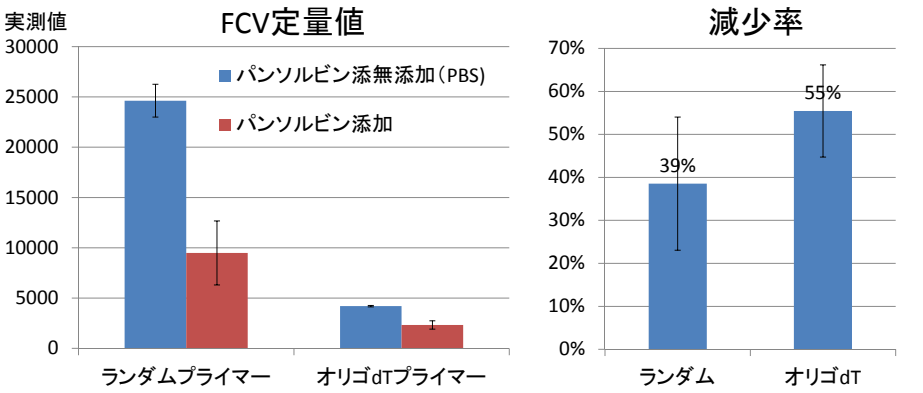


図33　mRNA結合ビーズ処理によるパンソルビンの影響の軽減

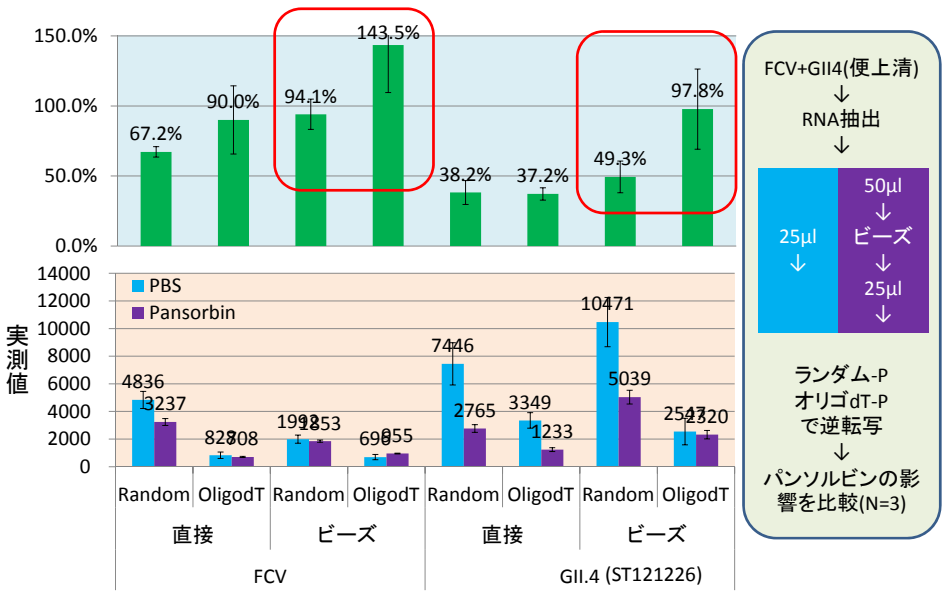


図34　mRNA結合ビーズ処理によるパンソルビンの影響の軽減
(少ないNov量)

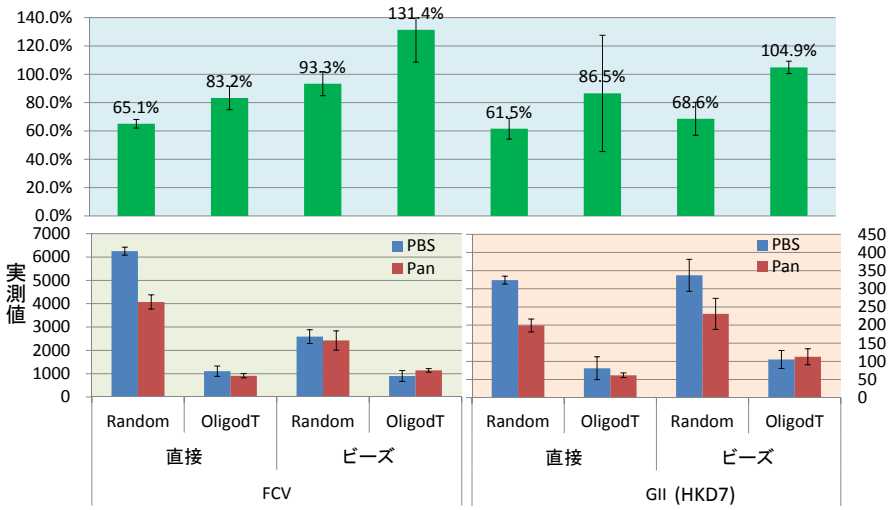
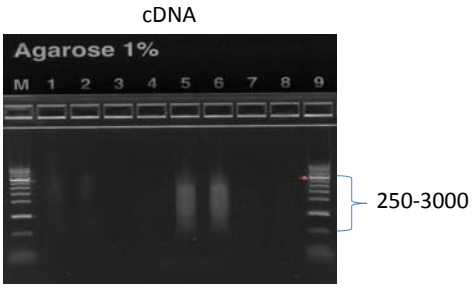
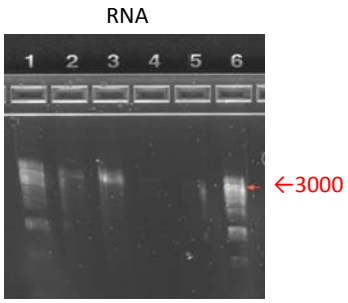


図35　FCV培養上清からRNA抽出後、mRNA精製および未精製のRNAおよびcDNAの電気泳動像



M	M	RNA	primer
1	F4	totalRNA	Oligo dT
2	F9		
3	F4	mRNA	
4	F9		
5	F4	totalRNA	Random
6	F9		
7	F4	mRNA	
8	F9		
9	M		



1	Marker	
2	F4	totalRNA
3	F9	totalRNA
4	F4	mRNA
5	F9	mRNA
6	Marker	

図36　mRNA分離用キットの比較

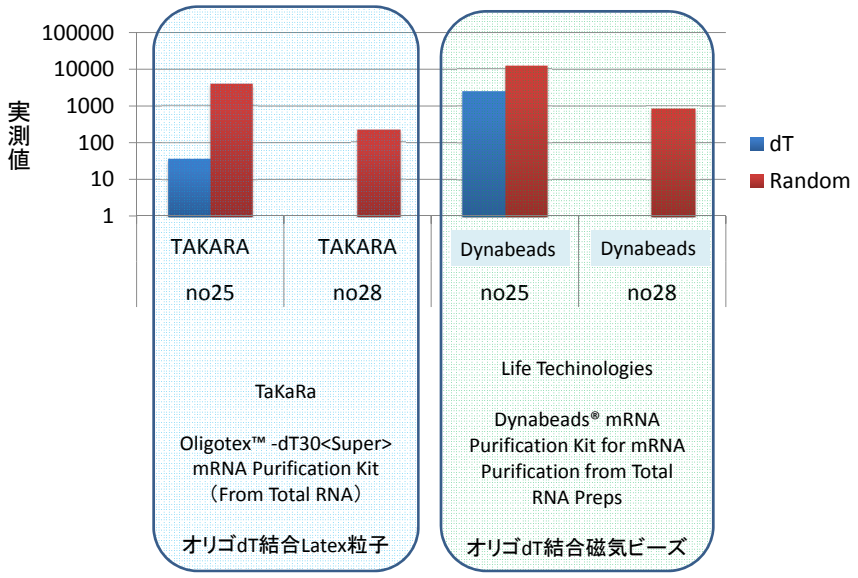


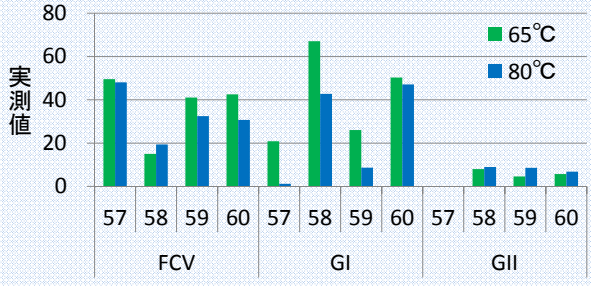
図37　Dynabeadsの使用方法(高感度化)の検討

1)　ダイナビーズからの溶出の必要性の有無

FCV	Ct値	
RNA no	溶出(-)	溶出(+)
13	ND	34.4
16	ND	39.0
19	ND	35.0
22	ND	40.3

⇒　溶出しなければいけない

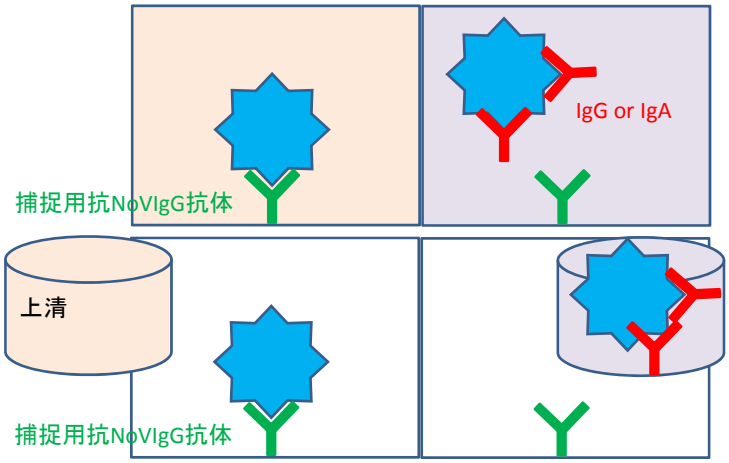
2)　溶出時の加熱温度　　アニールの解離　VS　加熱



ウイルス	平均	
	65℃	80℃
FCV	37.1	32.7
GI	41.1	24.9
GII	6.1	8.1

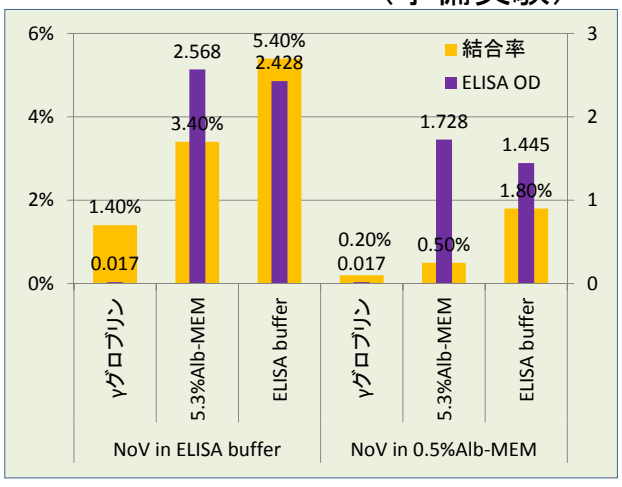
⇒　65℃がよさそう

図38　NoV検出ELISAの応用



	NoV	抗体に覆われているNoV
ELISA	陽性	陰性
上清のrt-PCR	陰性	陽性
プレート回収液のrt-PCR	陽性	陰性

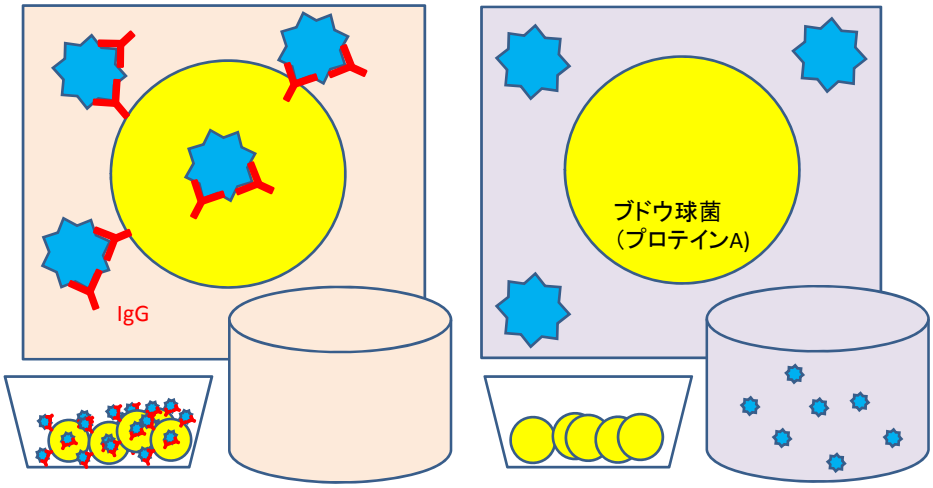
図39　ELISAプレートによる抗体被覆NoVの除去（予備実験）



ウイルス液+抗体（対照）
↓
RT,40min
↓　↓
上清　プレート
↓　↓　↓
rtPCR　AVLで回収　ELISA
rtPCR

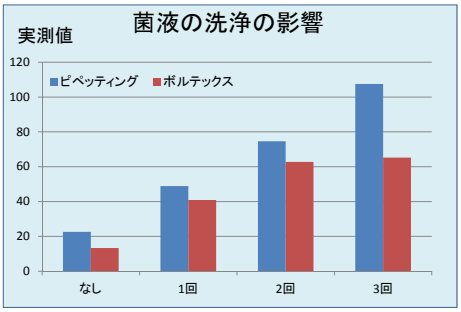
- 抗体非存在下でのELISAプレートへのウイルス粒子の結合率は0.9%～5.4%。ELISA検体希釈用緩衝液を用いると結合率が高くなる。
- ELISA吸光度ではγグロブリンによる阻止が明確に数字に表れるが、プレートへの結合ウイルス量ではそれほど明確に区別されない。

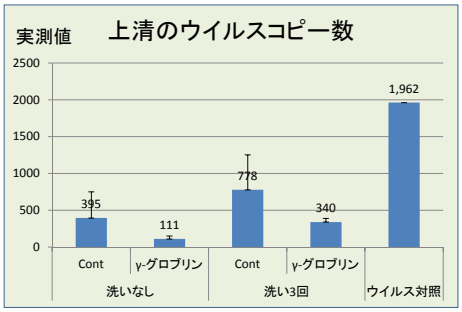
図40　パンソルビン･トラップ法の応用

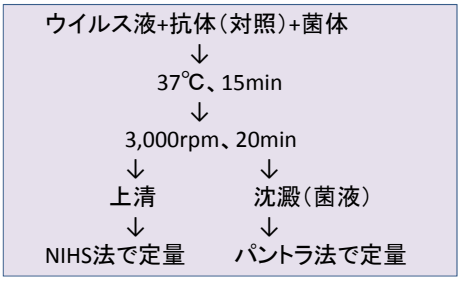


	抗体に覆われているNoV	覆われていないNoV
上清のrt-PCR	陰性	陽性
菌体のrt-PCR	陽性	陰性

図41　パンソルビン･トラップ法の応用に関する予備実験







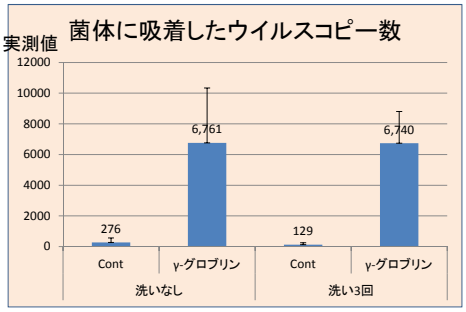


図42　パンソルビン添加によるNoV定量値への影響

昨年の研究では、パントラ法のマニュアル（Isogen+AVLで抽出⇒遠心⇒上清をQIAamp Viral RNA Mini Kitで精製⇒SSIIで逆転写)に従うと定量値が想定される値よりかなり低かった
↓
定量法の検討が必要
↓
パンソルビンから直接Roche Kitで抽出⇒ABI(High Cap RT Kit)で逆転写
＝FCV添加カキ濃縮材料にパンルビン（対照：PBS)を添加して定量(N=3)

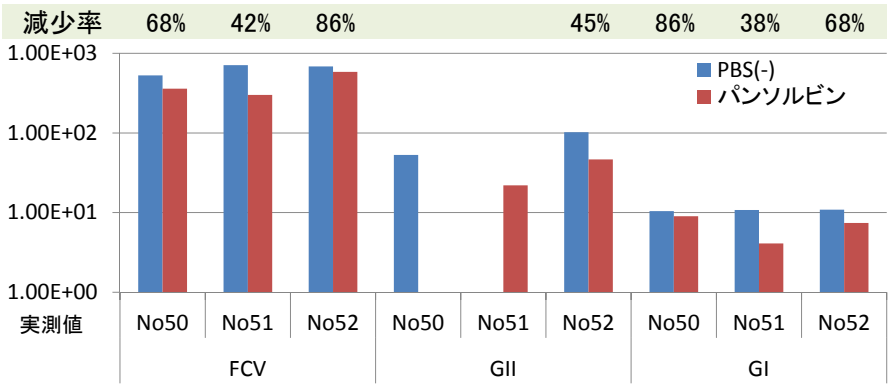
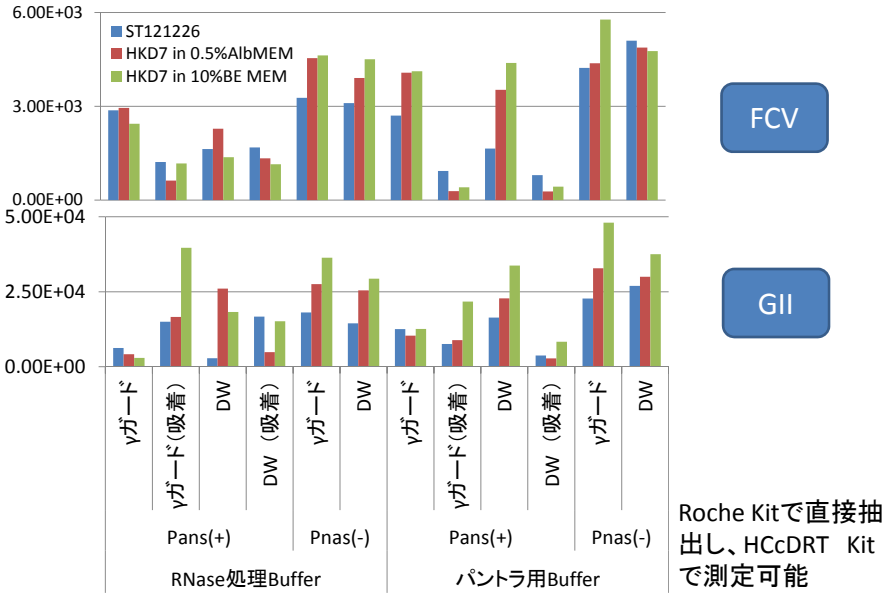


図43　パンソルビン処理



Roche Kitで直接抽出し、HCcDRT　Kitで測定可能

図44　FCVに対するGIIの割合

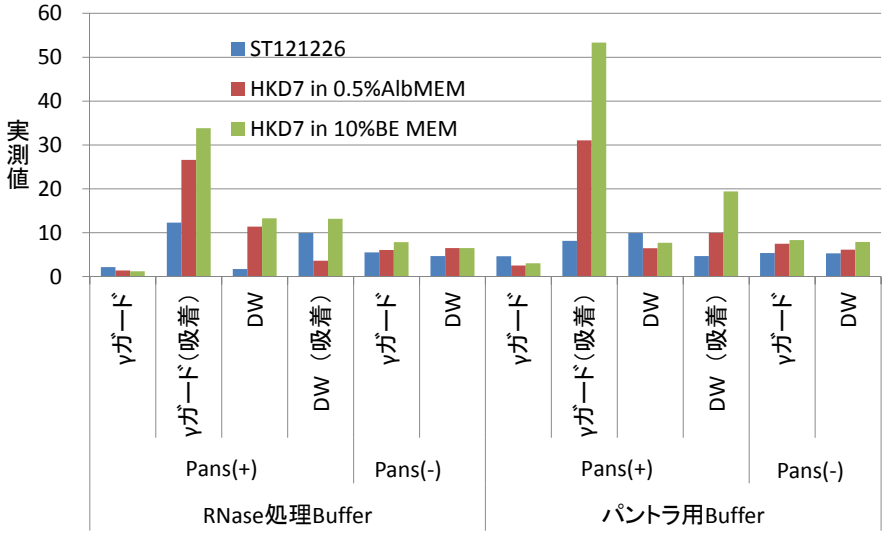
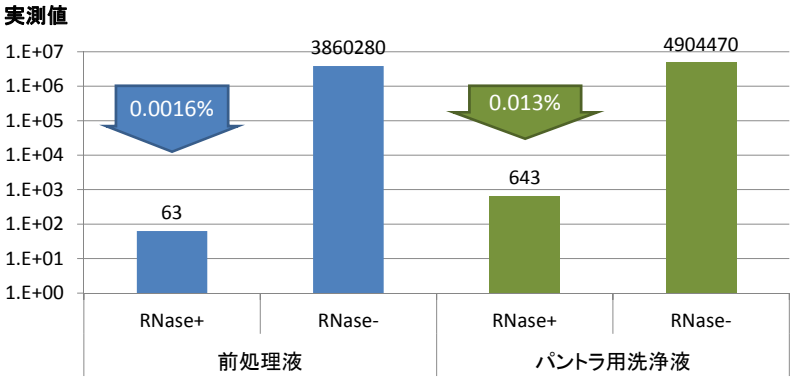


図45　RNase処理液とパントラ洗滌液におけるRNase処理



前処理液		パントラ洗滌液
10mM Tris-HCl (pH7.5) 50mM EDTA 2M Sodium Acetate	Reaction buffer (RNaseONE)	100mM Tris-HCl(pH8.4) 500mM NaCl 0.1% Tween20
0.5% Zwttergent in DDW		

表3-1　発症者糞便試料におけるNoV-抗体複合体の検索

区分	検体							
	a	(%)	b	(%)	c	(%)	d	(%)
A	360048.8		39645.7		40631		1608	
B	56626.7	15.7	10464.2	26.4	10145	25	328.3	20.4
C	23972.2	6.7	2103.3	5.3	NT		NT	
D	58228.9	16.2	5039.2	12.7	4381.2	10.8	197.9	12.3
E	60856	16.9	12898.6	32.5	9179.5	22.6	540.8	33.6

A：試料から直接抽出　　NT：not tested　（copy）
B：カラムに結合しなかったもの
C：カラムに結合したもの
D：抗IgA抗体反応後にカラムに結合しなかったもの
E：抗IgA抗体反応後にカラムに結合したもの

表3-2　不顕性感染者で継時的に採取された試料におけるNoV-抗体複合体の検索

test	sample					
	S１	7日後	S2	10日後	S3	13日後
A	490.5	8.3	3063.4	54.1	4518.9	31.9
B	290.1	ND	1616.1	42.3	1506.43	ND
C	99.5	13.7	219.6	14.2	720.131	16.3
D	78.4	ND	1287.2	53.2	561.421	ND
E	378.4	ND	564.8	ND	1645.4	16.8

A：試料から直接抽出　　ND：not detected　(copy)
B：カラムに結合しなかったもの
C：カラムに結合したもの
D：抗IgA抗体反応後にカラムに結合しなかったもの
E：抗IgA抗体反応後にカラムに結合したもの

表3-3　同一の不顕性感染者から継時的に採取された試料におけるNoV-抗体複合体の検索

経過日数	test		
	A	D	E
0	2624.2	690.8	2267.2
11	3001.1	1425.9	281
17	2938	1445.6	1234.4
21	99.8	ND	ND
27	526.3	122.4	172.2
35	97.2	ND	ND
45	900.1	350.3	ND

A：試料から直接抽出　　ND：not detected　(copy)
D：抗IgA抗体反応後にカラムに結合しなかったもの
E：抗IgA抗体反応後にカラムに結合したもの

図46　FCVにおけるPCR定量値と感染価

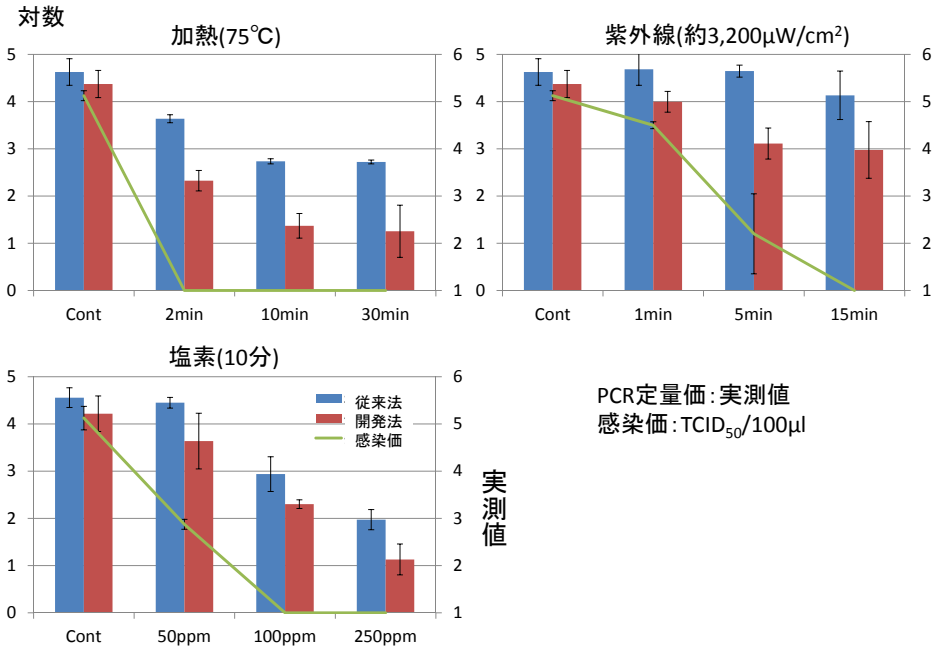
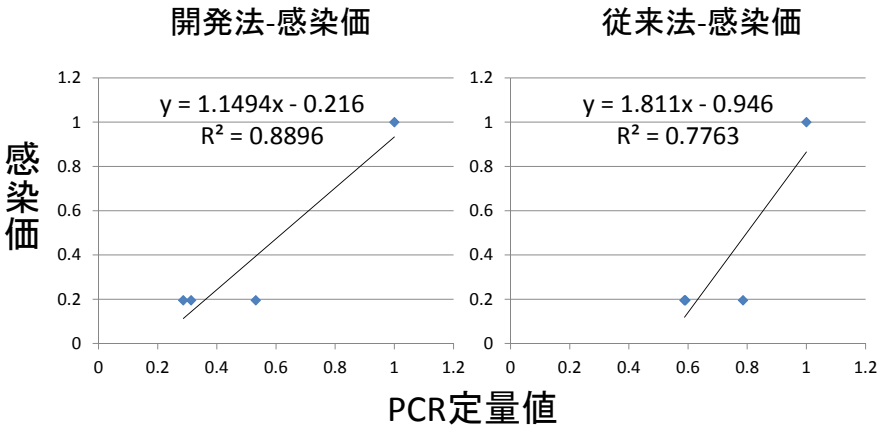
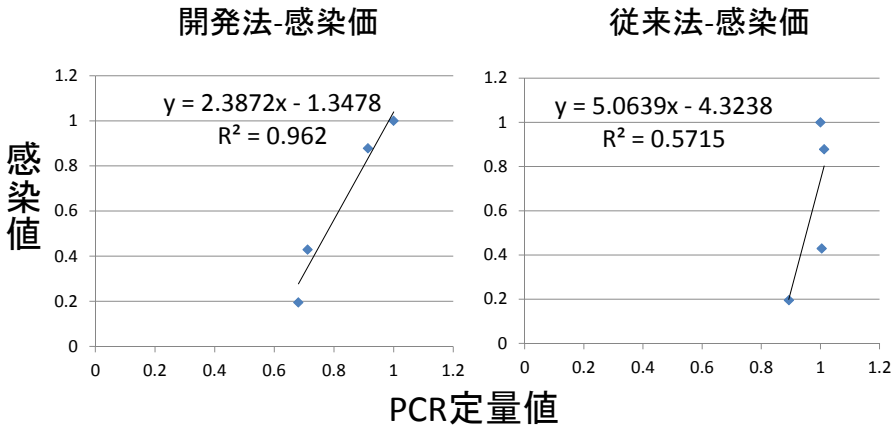


図47-1　FCVにおけるPCR定量値と感染価の相関性
（加熱、75℃：2分、10分、30分）



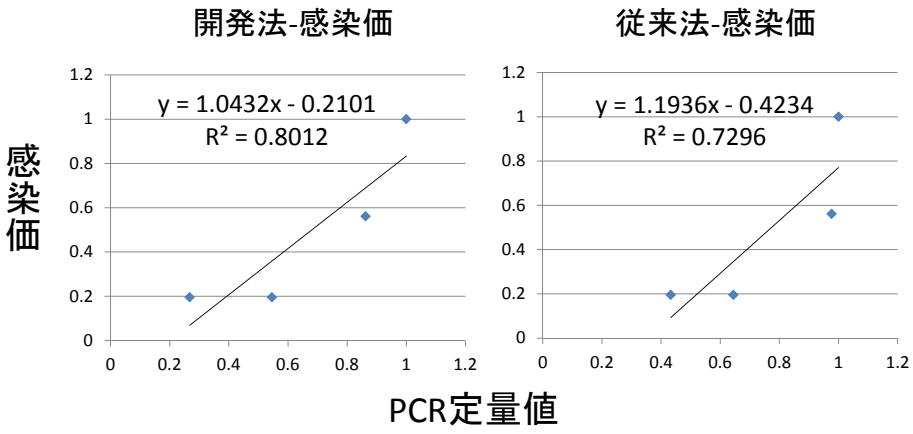
コントロールの値に対する比
（対数変換値を用いた）

図47-2　FCVにおけるPCR定量値と感染価の相関性
（UV、約3,200μW/cm²：1分、5分、15分）



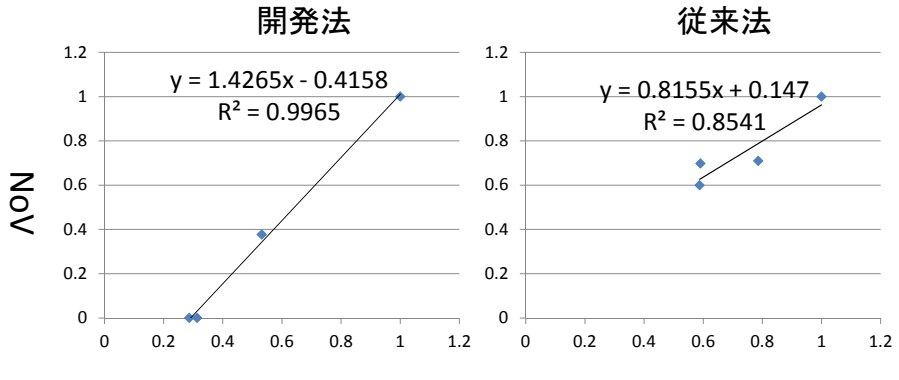
コントロールの値に対する比
（対数変換値を用いた）

図47-3　FCVにおけるPCR定量値と感染価の相関性
（塩素、10分：50ppm、100ppm、250ppm）



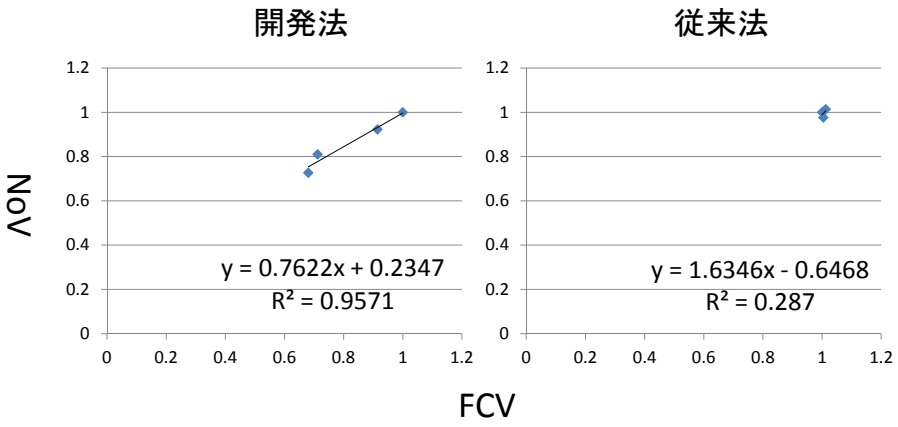
コントロールの値に対する比
（対数変換値を用いた）

図48-1　NoVとFCVのPCR定量値の相関性
（加熱、75℃：2分、10分、30分）



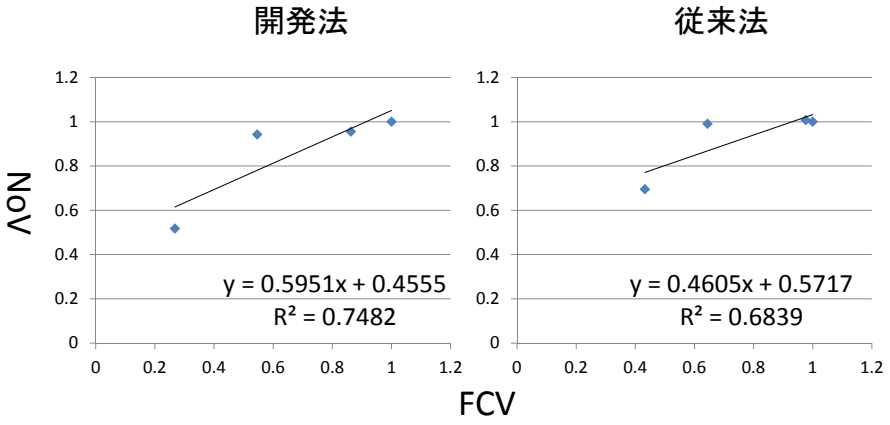
コントロールの値に対する比
（対数変換値を用いた）

図48-2　NoVとFCVのPCR定量値の相関性
（UV、約3,200μW/cm²：1分、5分、15分）



コントロールの値に対する比
（対数変換値を用いた）

図48-3　NoVとFCVのPCR定量値の相関性
（塩素、10分：50ppm、100ppm、250ppm）



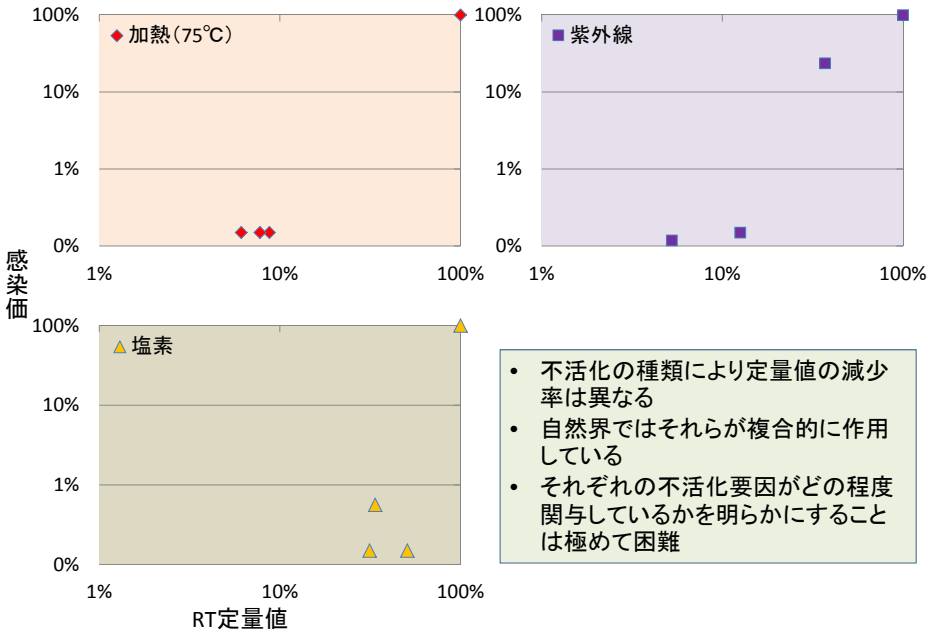
コントロールの値に対する比
（対数変換値を用いた）

表4　従来法に対する開発法の定量値の減少率

不活化条件		定量値の減少率		感染価
		NoV	FCV	(TCID50/100μL)
加熱（75℃）	Cont	100%*	100%	133352(100%**)
	2min	11%	9%	<200(<0.1%)
	10min	0%	8%	<200(<0.1%)
	30min	0%	6%	<200(<0.1%)
紫外線（約3,200μW/cm2)	Cont	100%	100%	133352(100%)
	1min	48%	37%	31623(23.7%)
	5min	28%	5%	158(0.1%)
	15min	23%	13%	<200(<0.1%)
塩素（10分）	Cont	100%	100%	133352（100%)
	50ppm	67%	34%	750(0.6%)
	100ppm	70%	51%	<200(<0.1%)
	250ppm	40%	31%	<200(<0.1%)

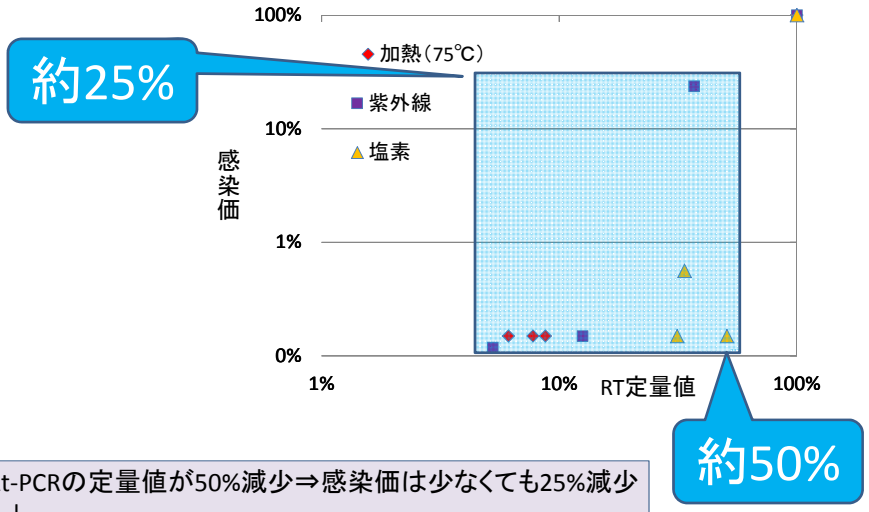
*：開発法と従来法で得た値を補正し、対照(不活化していない)の定量値を100%とした場合の、各不活化処理における従来法に対する開発法の定量値の減少率を示した。
**:未処理の感染価を100%とした場合の、各処理の感染価の割合。

図49-1　FCVの感染価と定量値減少率の関係



- 不活化の種類により定量値の減少率は異なる
- 自然界ではそれらが複合的に作用している
- それぞれの不活化要因がどの程度関与しているかを明らかにすることは極めて困難

図49-2　FCVの感染価と定量値減少率の関係



Rt-PCRの定量値が50%減少⇒感染価は少なくても25%減少
↓
従来法：100コピー/g
感染性粒子推定検出法(補正値)：50コピー/g
⇒　感染性粒子数は少なくても、25コピー以下/g

図50-1　乾燥状態(清浄環境：0.5%Alb-MEM)での生存性試験

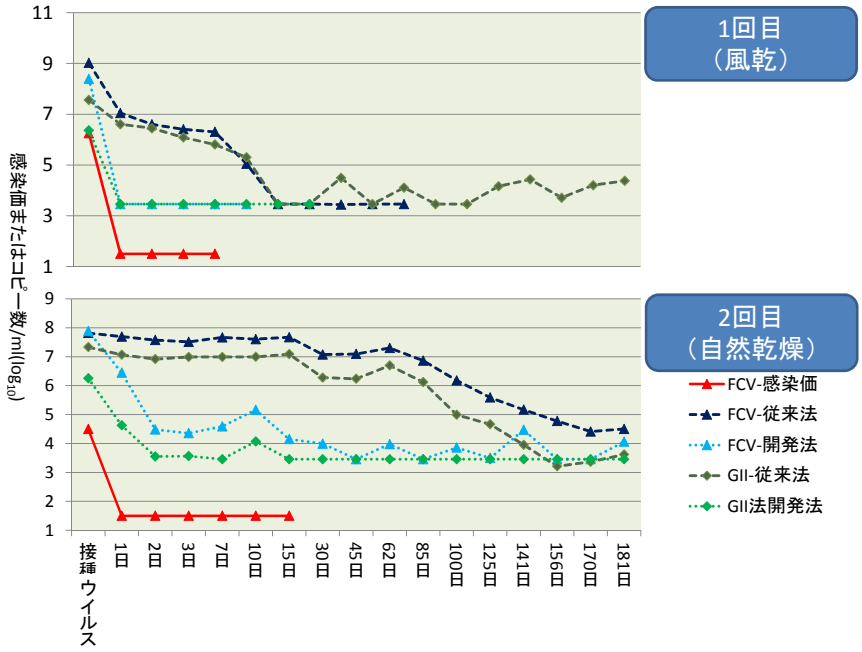


図50-2　乾燥状態(汚染環境：10%BE-MEM)での生存性試験

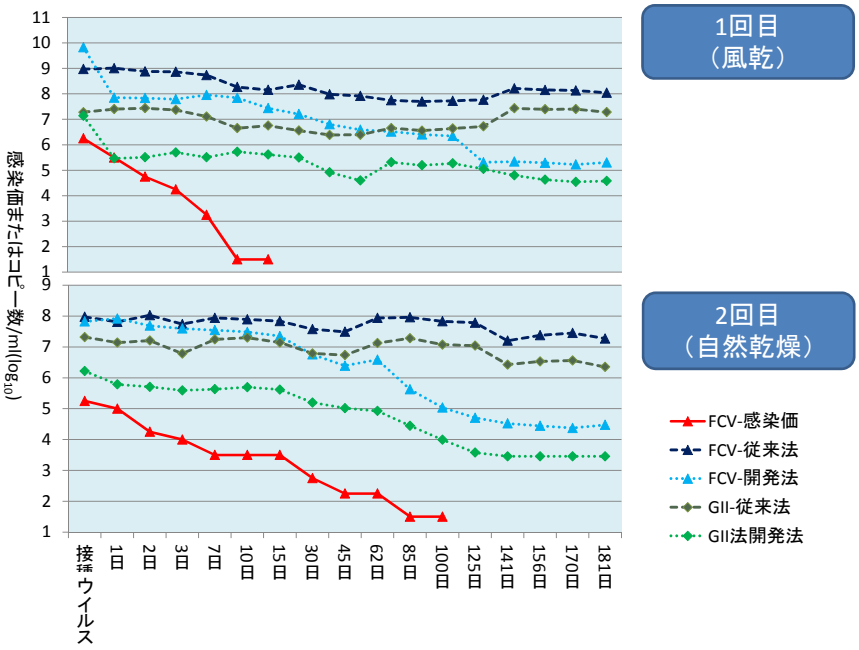


図50-3　乾燥状態(汚染環境：10%便上清-MEM)での生存性試験

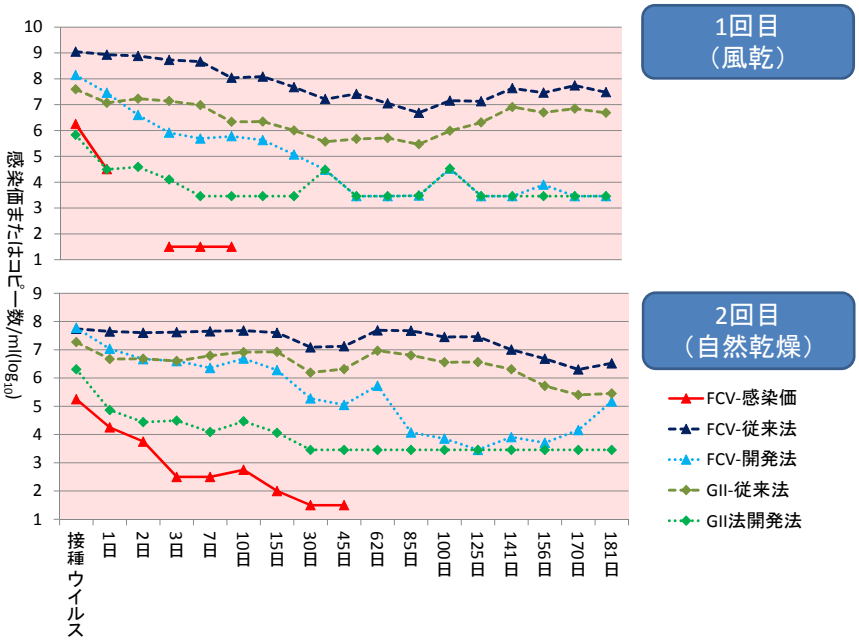


図51-1 水溶液における保存試験

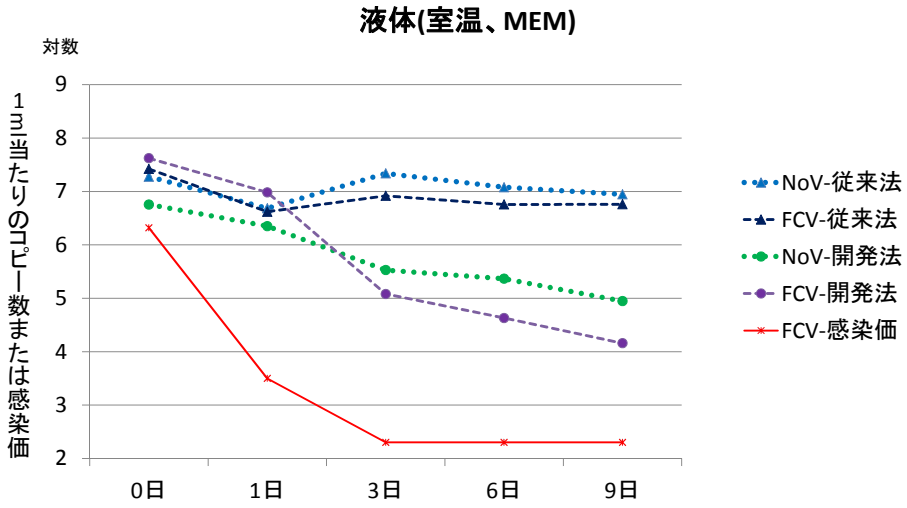


図51-2 水溶液における保存試験

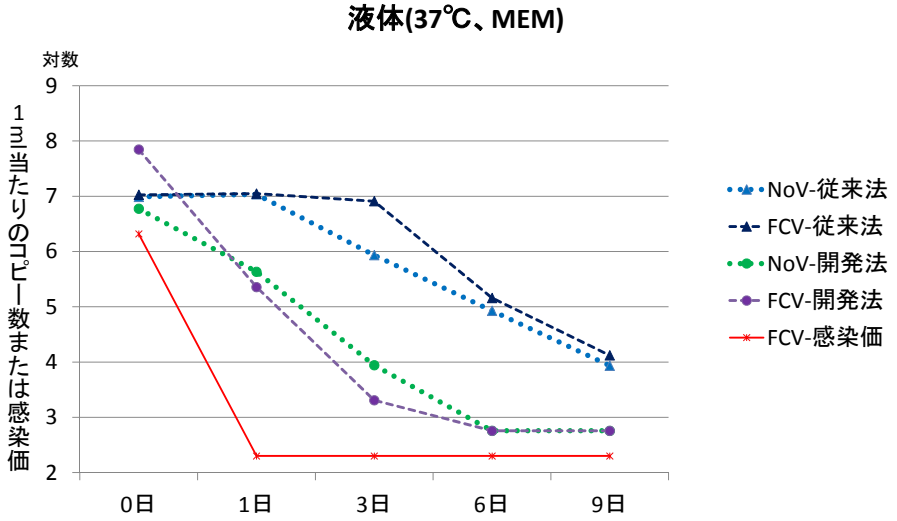


図51-3水溶液における保存試験

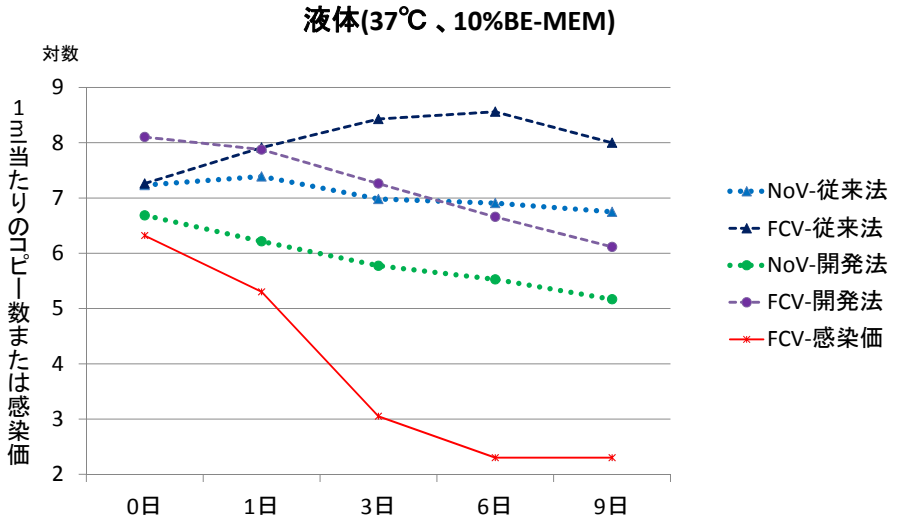


図52-1　海水での生存性試験（夏期）

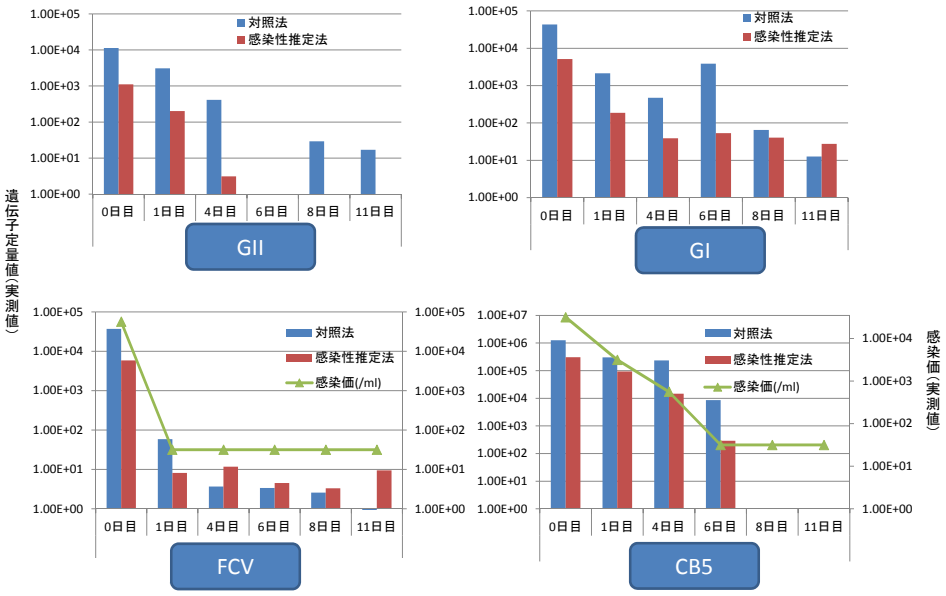
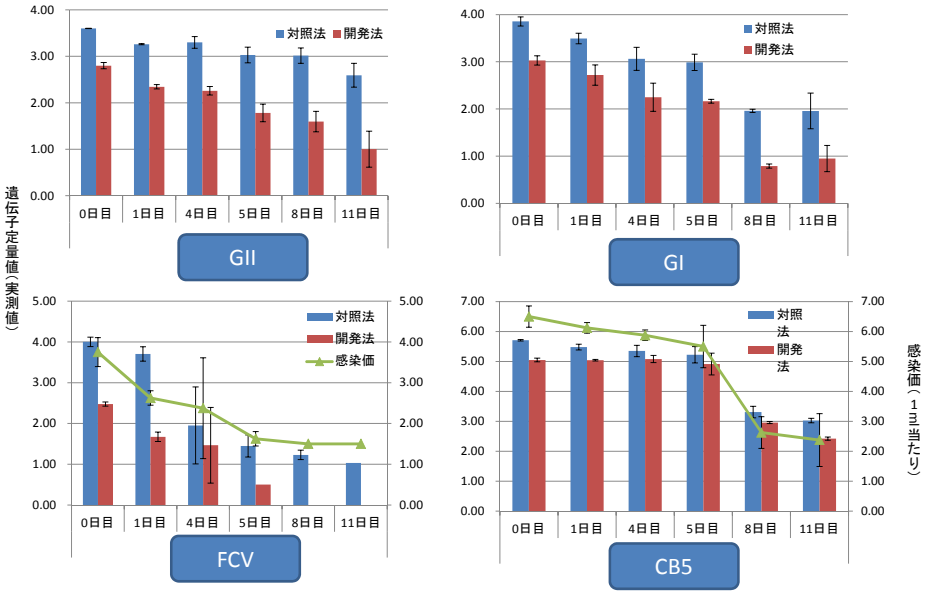


図52-2　海水での生存性試験（冬期）



感染価および遺伝子定量値は、2回の実験の幾何平均値

図53　海水での生存性試験(冬期)における開発法と対照法の定量値の比

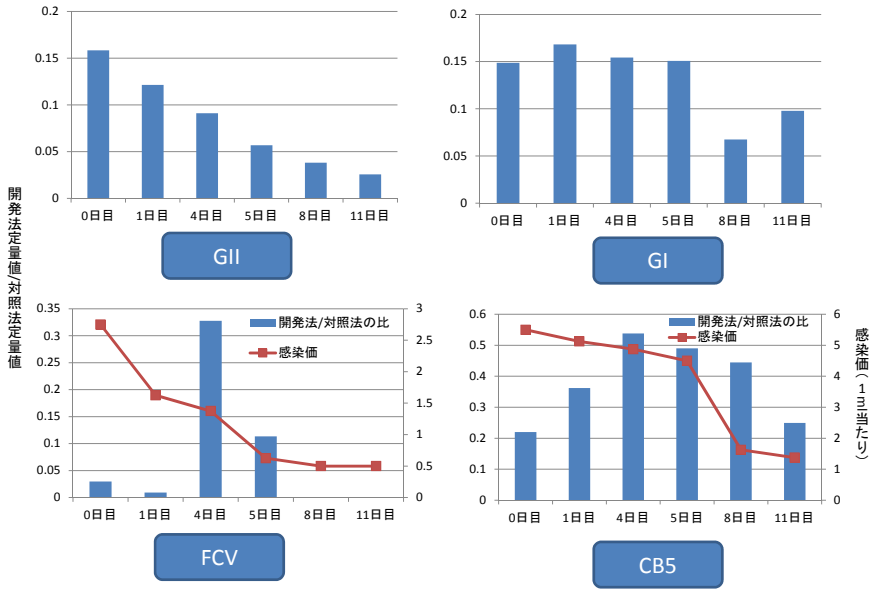
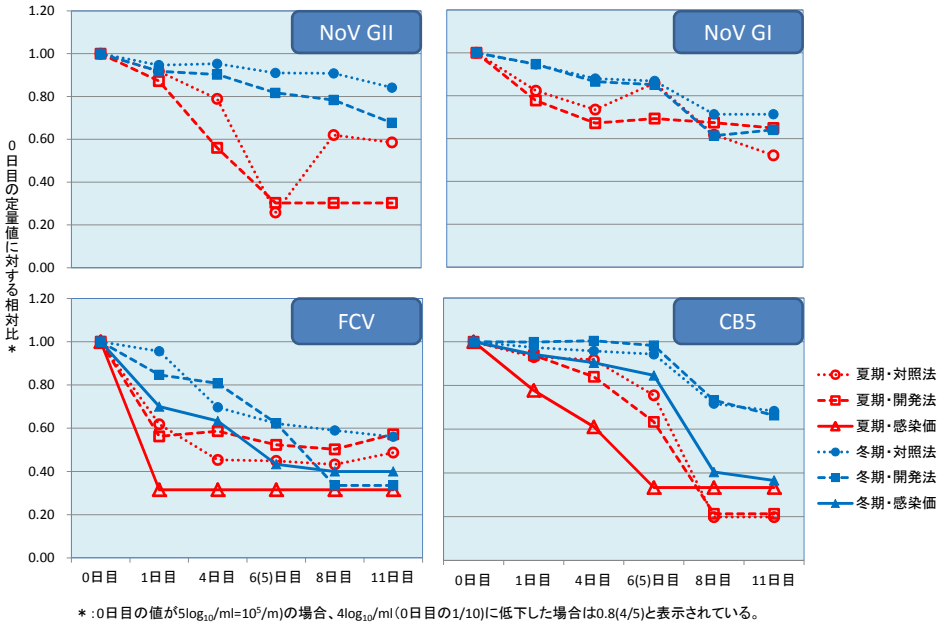


図54　海水での生存性試験（夏期および冬期のまとめ）



＊：0日目の値が5log$_{10}$/ml=10^5/m)の場合、4log$_{10}$/ml（0日目の1/10)に低下した場合は0.8(4/5)と表示されている。

図55　下水放流水中（塩素濃度0.4～0.6ppm)での生存性試験

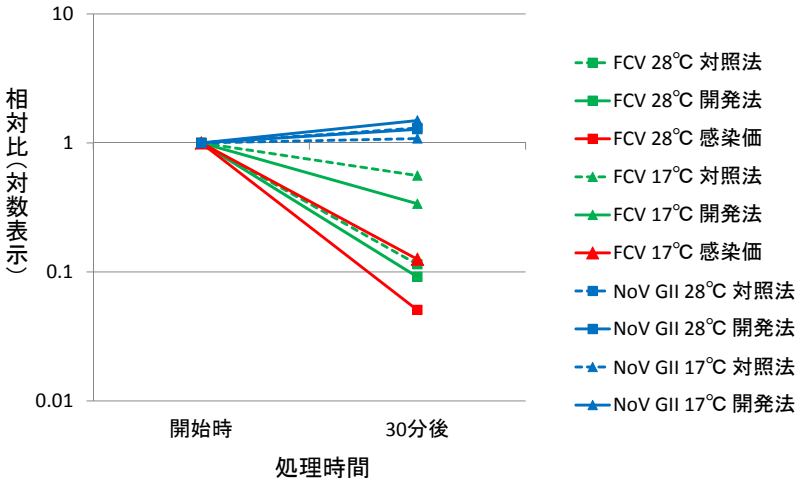


図56-1　60℃加熱による遺伝子定量値および感染価の経時変化

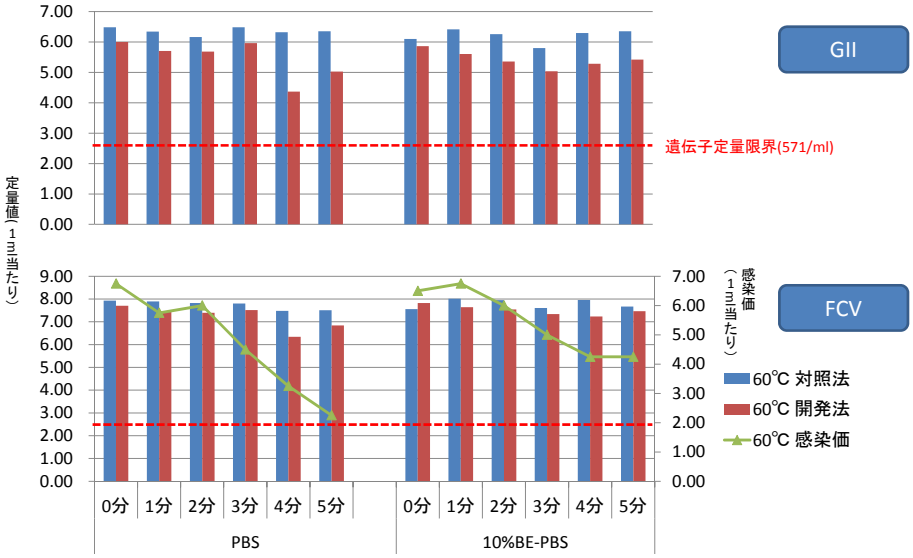


図56-2　65℃加熱による遺伝子定量値および感染価の経時変化

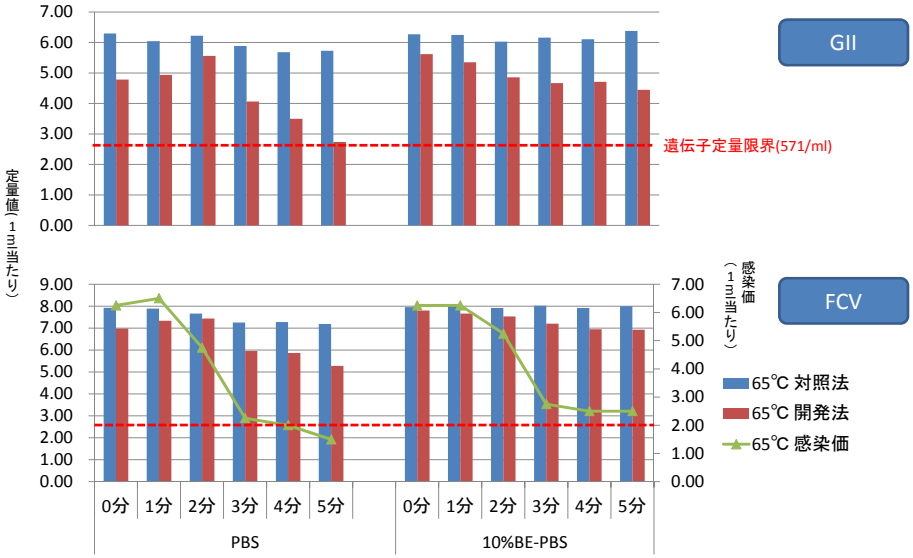


図56-3　70℃加熱による遺伝子定量値および感染価の経時変化

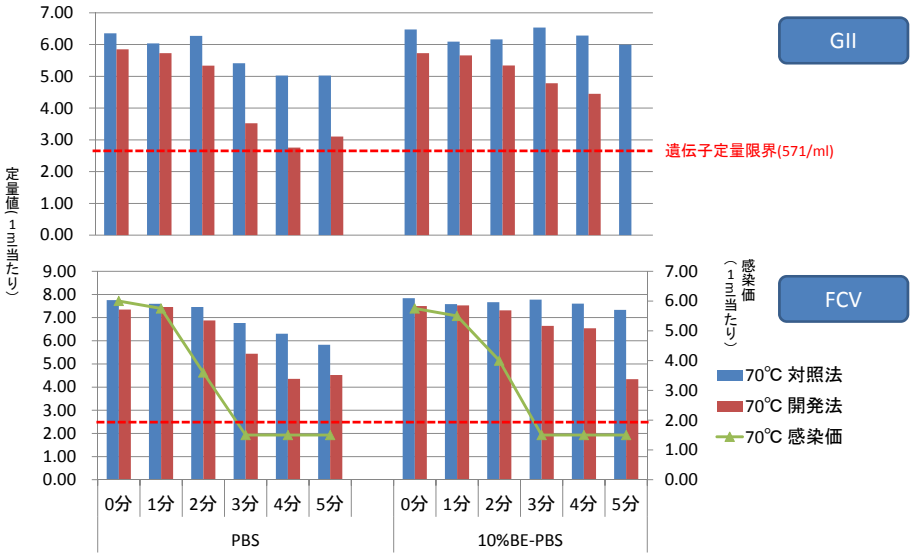


図56-4　75℃加熱による遺伝子定量値および感染価の経時変化

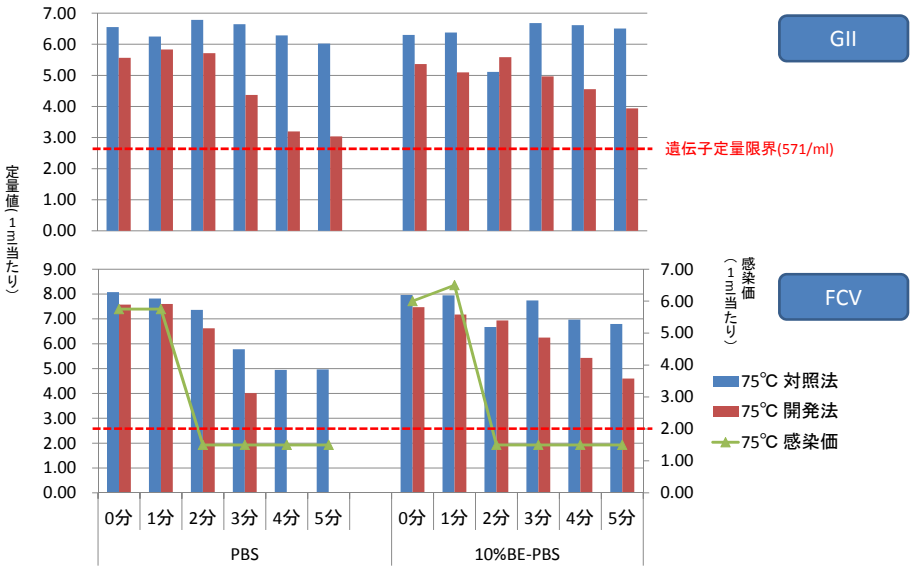


図56-5　80℃加熱による遺伝子定量値および感染価の経時変化

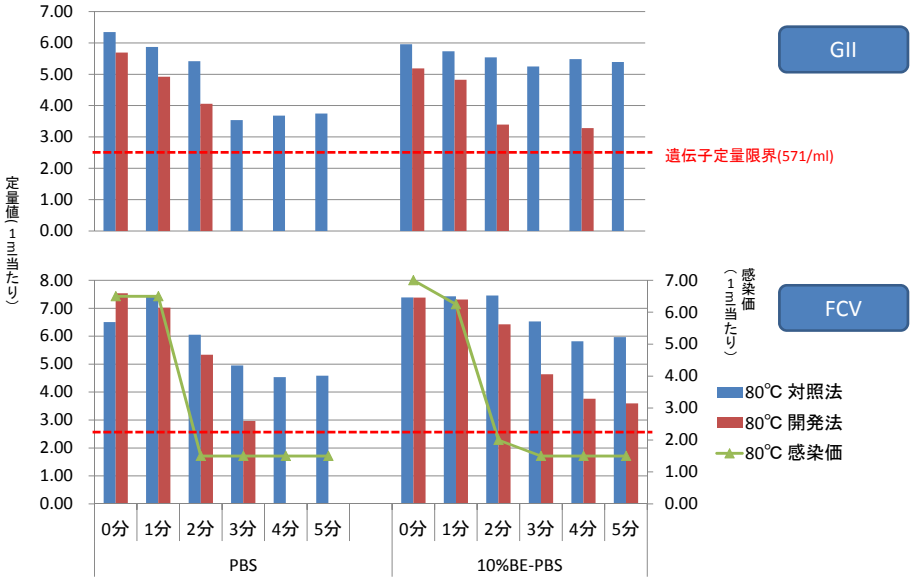


図56-6　85℃加熱による遺伝子定量値および感染価の経時変化

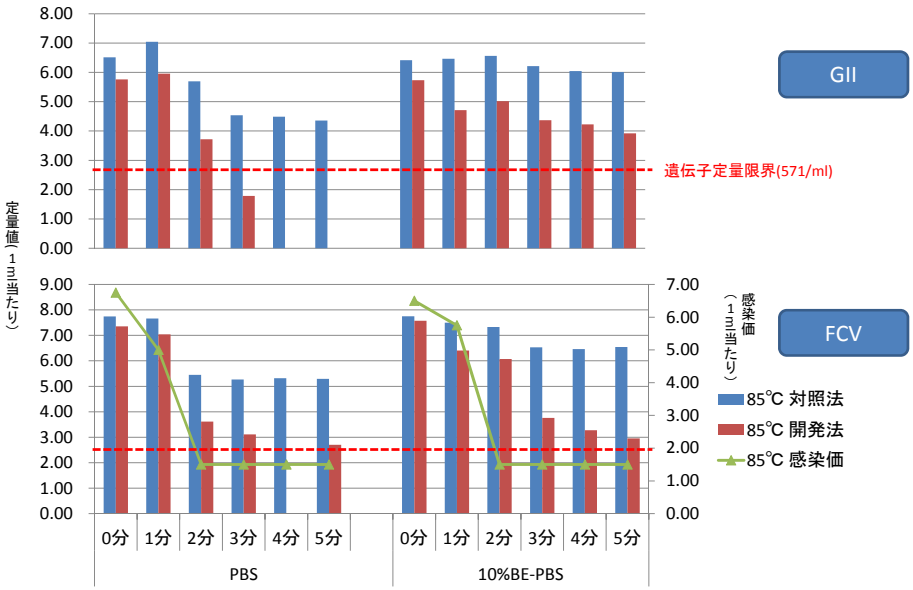


図56-7　90℃加熱による遺伝子定量値および感染価の経時変化

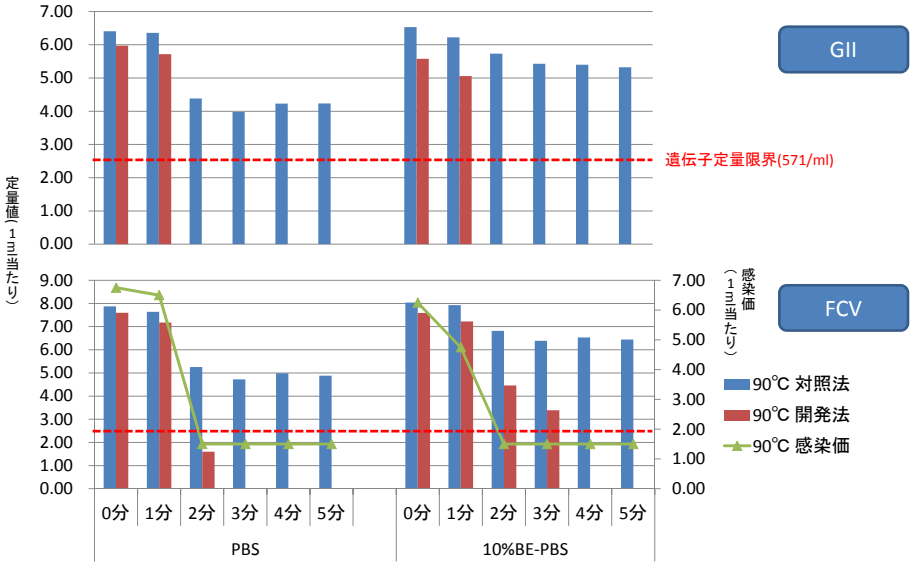
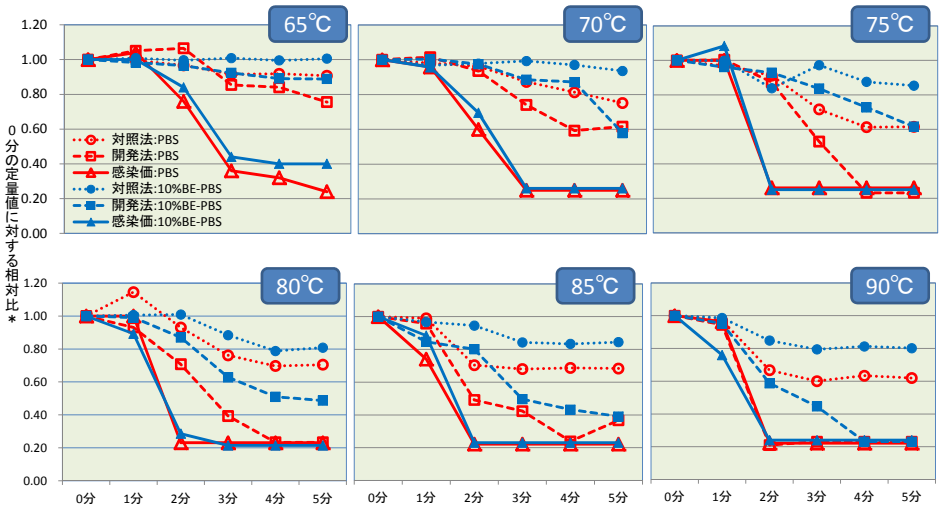
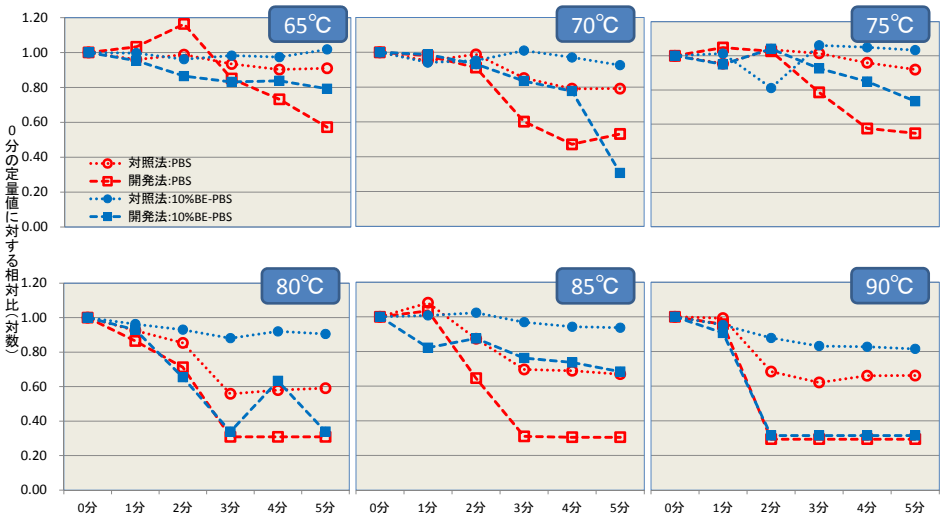


図57-1　ネコカリシウイルスの加熱による遺伝子定量値および
感染価の経時変化



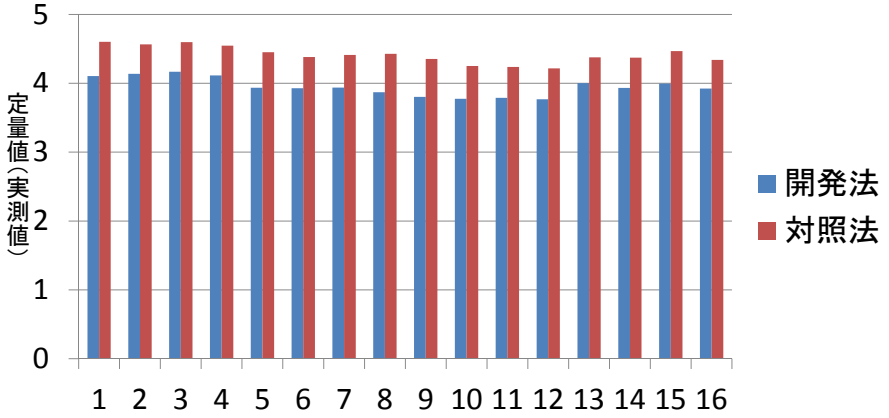
＊:0分の値が$5\log_{10}$/ml=10^5/m)の場合、$4\log_{10}$/ml（0分の1/10)に低下した場合は0.8(4/5と表示されている。

図57-2　ノロウイルスGIIの加熱による遺伝子定量値の経時変化



＊:0分の値が$5\log_{10}$/ml=10^5/m)の場合、$4\log_{10}$/ml（0分の1/10)に低下した場合は0.8(4/5と表示されている。

図58　FCV接種ウイルス液の開発法と対照法の
定量値の比較(N=16)



	開発法	対照法	開発法/対照法
幾何平均値	3.95±0.13	4.41±0.12	-0.46
実数変換値	8883.085	25830.98	0.343

図59　市販カキの感染性推定遺伝子検査法による検査結果

ウイルス	FCV			NoV GII			NoV GI		
件数	104			16			2		
項目	開発法	対照法	開発法/対照法	開発法	対照法	開発法/対照法	開発法	対照法	開発法/対照法
幾何平均値（中腸腺1g当たり）	4.62	5.08	−0.46	1.47	1.60	−0.75	0.69	0.69	−1.03
標準偏差	0.86	0.73		4.97	0.58		1.51	0.87	
平均値の実数変換値	41324.37	121502.80	0.34	29.85	40.21	0.18	4.88	4.88	0.09

FCV接種ウイルス液における開発/対照法の比：0.34(N=16)

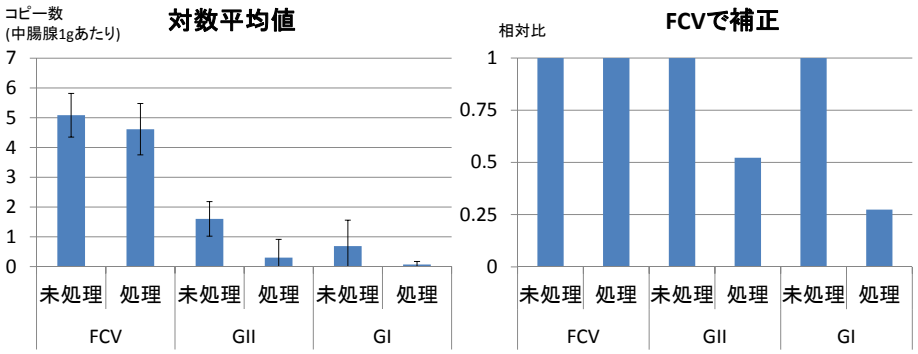


表5　感染性推定遺伝子検査法と対照法の比較

項目		ノロウイルスGI（N=140）		ノロウイルスGII（N=140）	
		感染性推定遺伝検査法	対照法	感染性推定遺伝子検査法	対照法
陰性数(%)		137 (97.9%)	114 (81.4%)	124 (88.6%)	71 (50.7%)
陽性(実測値0以上)(%)		3 (2.1%)	26 (18.6%)	16 (11.4%)	69 (49.3%)
陽性の内訳	定量値0～10未満	3	7	15	47
	定量値10以上	0	19	1	22
陽性例の定量値の算術平均値		5.6	62.0	2.7	10.6
陽性例の定量値の幾何平均値		5.5	14.4	1.5	5.4

図60　平成24年度暫定法による患者便からのノロウイルスの検出

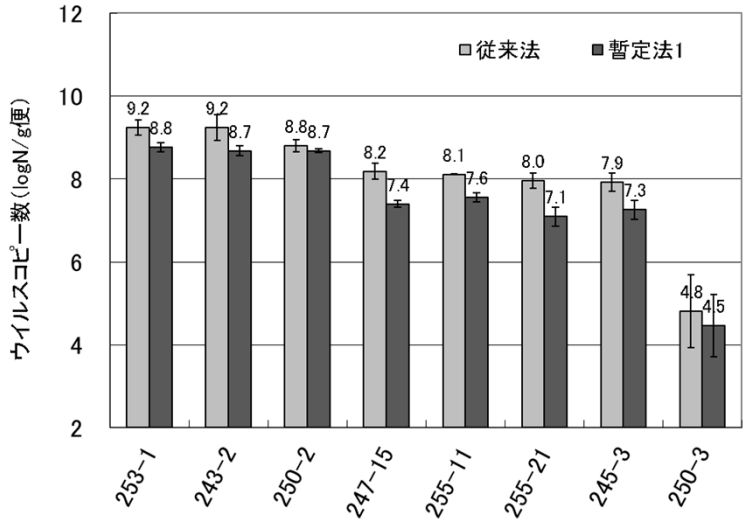


表6　E海域採取カキの暫定法1および従来法におけるノロウイルス定量値

採取月	Genogroup I					Genogroup II				
	従来法	暫定法1		相対比		従来法	暫定法1		相対比	
	(A1)	補正前 (B1)	補正後[1] (C1)	(B1/A1)	(C1/A1)	(A2)	補正前 (B2)	補正後[1] (C2)	(B2/A2)	(C2/A2)
11月	765	412.5	1447.4	0.54	1.89	6330	400	1403.5	0.06	0.22
1月	37200	3450	12105.3	0.09	0.33	193200	8050	28245.8	0.04	0.15
3月	753	0	0	–	–	465	0	0	–	–

[1]補正前の数値を患者便での相対比（従来法/暫定法1）0.285で除した値

図61-1　A～D海域採取カキの暫定法1および従来法におけるノロウイルスGI定量値

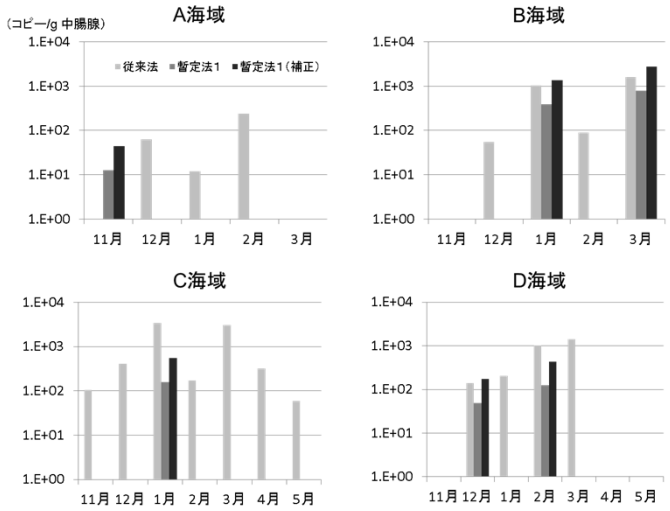


図61-2　A～D海域採取カキの暫定法1および従来法におけるノロウイルスGII定量値

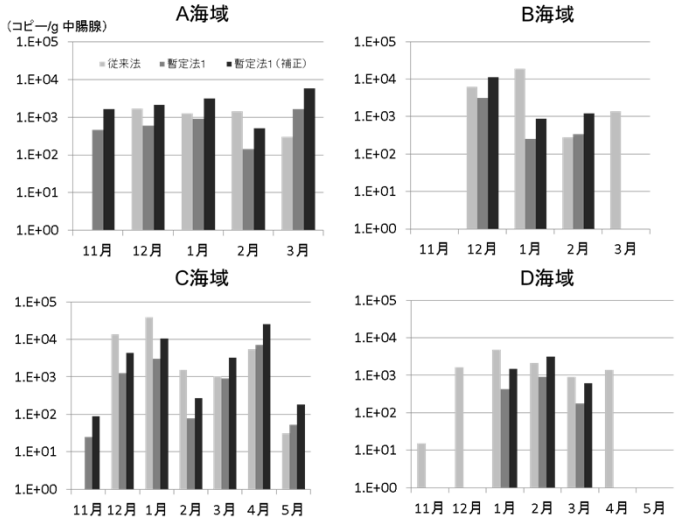


表7　E海域採取カキの暫定法2および対照法における ノロウイルス定量値

採取月	Genogroup Ⅰ			Genogroup Ⅱ		
	対照法 (A1)	暫定法2 (補正後) (B1)	相対比 (B1/A1)	対照法 (A2)	暫定法2 (補正後) (B2)	相対比 (B2/A2)
11月	2390	0	−	18200	13400	0.74
1月	9360	4310	0.46	143000	85600	0.60
3月	242	0	−	613	336	0.55

図62-1　A～D海域採取カキの暫定法2および従来法におけるノロウイルスGI定量値

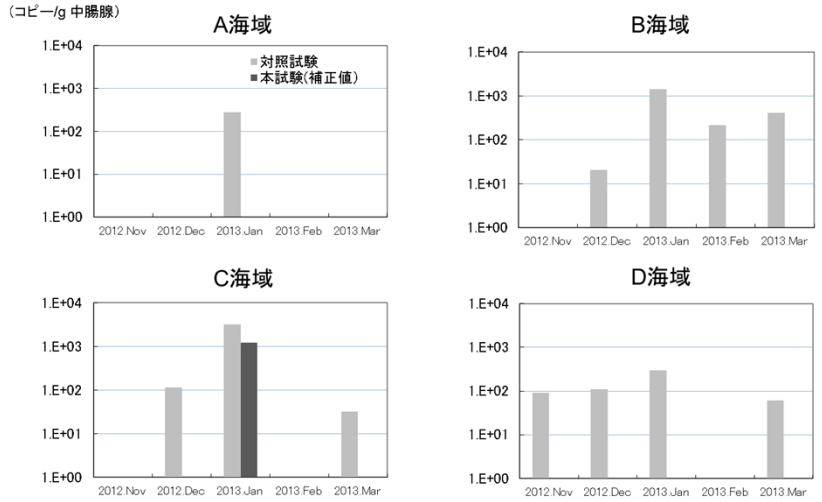


図62-2　A～D海域採取カキの暫定法2および従来法におけるノロウイルスGII定量値

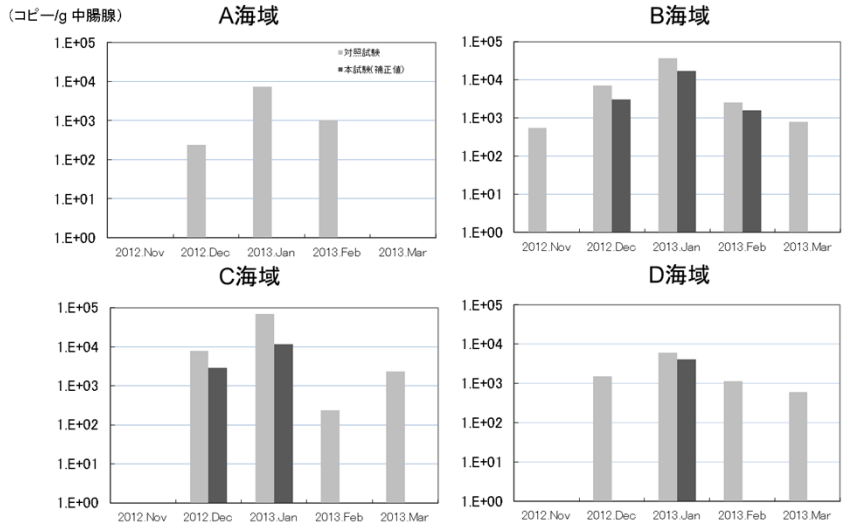


表8　1月期における各海域のノロウイルス定量値と相対比

海域	対照法		暫定法2（補正値）		ウイルス量比 NoV GII/NoV GI	暫定法2（補正値）/対照法	
	NoV GI （A1）	NoV GII （A2）	NoV GI （B1）	NoV GII （B2）	（A2/A1）	NoV GI （B1/A1）	NoV GII （B2/A2）
A	280	7260	0	0	25.9	–	–
B	1440	36500	0	16800	25.3	–	0.46
C	3160	69000	1214	11481	21.8	0.38	0.17
D	294	6090	0	4030	20.7	–	0.66
E	9360	143000	4310	85600	15.3	0.46	0.60

表9　2013年2月購入市販カキにおけるノロウイルス定量値と相対比

海域	対照法		暫定法2（補正値）		ウイルス量比 NoV GII/ NoV GI	暫定法2（補正値）/対照法
	NoV GI（A1）	NoV GII（A2）	NoV GI（B1）	NoV GII（B2）	（A2/A1）	NoV GII（B2/A2）
F	0	885	0	0	–	–
G	81	1140	0	1010	14.1	0.89
H	0	764	30	0	–	–
I	485	6000	0	4219	12.4	0.70
J	402	4510	0	2605	11.2	0.58
K	11	1310	0	512	119.1	0.39
L	560	9100	0	1956	16.3	0.21

表10 従来法および定量開発法による糞便中の NV GII 定量値（平成 24 年度）

検体番号	従来法	定量開発法 （補正値）*
1	1962500.0	**2407407.4**
2	615000.0	**675925.9**
3	**196482500.0**	73277777.8
4	129245833.3	**189722222.2**
5	50720000.0	**81962963.0**
6	**9428337500.0**	259101851.9
7	60671666.7	**331731481.5**
8	15033420833.3	**93516583333.3**

*補正値＝得られた定量値÷0.09（相対比）

単位：糞便 1g 当たりのコピー数

両法の定量値のうち、高い値を太字で示した。

表 11 従来法および定量開発法によるカキ中腸腺の NV 定量値（平成 24 年度）

検体番号	GI		GII	
	従来法	定量開発法 （補正値）*	従来法	定量開発法 （補正値）*
1-1	0.06	**0.11**	**13.99**	9.35
1-2	**0.68**	0.11	**5.12**	0.27
2-1	0.00	0.00	1.75	**117.94**
2-2	0.05	**0.29**	0.82	**1.70**
3-1	0.05	**0.22**	0.84	**4.00**
3-2	0.00	0.00	0.15	**0.26**
4-1	0.00	0.00	0.85	**1.10**
4-2	0.00	0.00	1.60	**27.52**

*補正値＝得られた定量値÷相対比 （GI:1.146、GII:4.109）

単位：カキ中腸腺 1g 当たりのコピー数

両法の定量値のうち、高い値を太字で示した。

表 12　対照試験および本試験による糞便中の NV GII 定量値（平成 25 年度）

検体番号	対照試験 C	本試験（補正値）* cT	cT/C
1	**14305433.2**	132110.6	0.009
2	**16515810.4**	5830998.1	0.353
3	**926461284.0**	63135261.4	0.068
4	**328368195.0**	18770456.4	0.057
5	**346505063.0**	13960463.9	0.040
6	**1295712026.0**	55201634.6	0.043
7	**97038245.6**	5658594.8	0.058

*補正値（cT）＝得られた定量値÷検体別の FCV 相対比（0.194～0.407）

単位：糞便 1g 当たりのコピー数

両法の定量値のうち、高い値を太字で示した。

表 13　対照試験および本試験によるカキ中腸腺の NV 定量値（平成 25 年度）

検体番号	GI			GII		
	対照試験 C	本試験（補正値）* cT	cT/C	対照試験 C	本試験（補正値）* cT	cT/C
1-1	99.10	0	0	166.19	0	0
1-2	0	0	0	14.84	0	0
2-1	0	0	0	100.95	0	0
2-2	41.25	0	0	0	0	0
3-1	0	0	0	1.81	0	0
3-2	318.93	0	0	231.47	0	0
4-1	0	0	0	37.12	0	0
4-2	0	0	0	52.85	0	0

*補正値（cT）＝得られた定量値÷検体別の FCV 相対比（0.001～0.081）

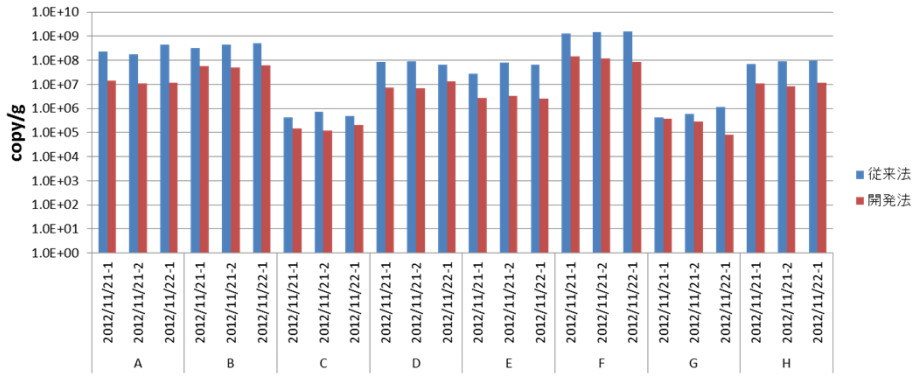
単位：カキ中腸腺 1g 当たりのコピー数

表 14　FCV 定量値による回収率（平成 25 年度）

	糞便		カキ	
	対照試験	本試験	対照試験	本試験
添加 FCV	29793816	7392736	43889984	22251680
検体中 FCV	21140176	6568508	2499952	43648
回収率	71.0%	89.0%	5.7%	0.2%

単位：FCV 5μl 当たりのコピー数

図63　開発法および従来法による便検体中のノロウイルスGII定量結果



相対比　0.291

表15. 感染性推定遺伝子検出法を用いた下水のノロウイルス定量結果

番号	検体名	種類	採水年月	定量値(1ml当たり)				実測値に基づく減少率			
				開発法		従来法		開発法/従来法の比		開発法/従来法の比の平均	
				GI	GII	GI	GII	GI	GII	GI	GII
1	B	流入水	2011.12	1.95	3.69	2.37	4.33	−0.424	−0.637	−0.390	−0.288
2	C	〃	2011.12	0.84	3.82	1.62	3.88	−0.786	−0.058	*0.407*	*0.515*
3	D	〃	2011.12	1.81	3.54	1.99	4.57	−0.172	−1.032		
4	D	〃	2012.4	1.14	3.53	2.03	4.27	−0.891	−0.747		
5	B	〃	2012.12	0.84	2.52	1.32	3.39	−0.485	−0.873		
6	C	〃	2012.12	1.31	3.71	2.06	3.59	−0.743	0.116		
7	D	〃	2012.12		3.55		2.15		1.403		
8	B	〃	2013.1	1.54	2.96	1.34	3.89	0.194	−0.933		
9	C	〃	2013.1	1.74	3.72	1.97	3.55	−0.228	0.170		
10	D	〃	2013.1	1.90		1.88	3.16	0.023			
1	B	放流水	2011.12		3.07		3.44		−0.373		−0.480
2	C	〃	2011.12		1.24	1.30	2.68		−1.448		*0.331*
3	D	〃	2011.12		3.95		3.08		0.872		
4	D	〃	2012.4		2.25		3.23		−0.973		
5	B	〃	2012.12								
6	C	〃	2012.12								
7	D	〃	2012.12								
8	B	〃	2013.1								
9	C	〃	2013.1								
10	D	〃	2013.1			1.11	1.45				

空白:検出限界値以下　　斜体の値は実数変換値

表16. 感染性推定推定遺伝子検査法を用いた下水のノロウイルス定量結果(実数)

番号	検体名	種類	採水年月	定量値(1ml当たり)						実測値に基づく減少率			
				本試験			対照試験			本試験/対照試験の比		本試験/対照試験の比の平均	
				FCV	GI	GII	FCV	GI	GII	GI	GII	GI	GII
1	B	流入水	2012.12	241	46	5367	1514	490	34861	0.094	0.154	0.284	0.195
2	C	〃	2012.12	316	225	6139	634	596	29314	0.378	0.209		
3	D	〃	2012.12	175	14	3204	1001	69	26066	0.210	0.123		
4	B	〃	2013.1	447	21	5187	1748	45	31945	0.468	0.162		
5	C	〃	2013.1	286	112	6428	984	328	37900	0.341	0.170		
6	C	〃	2013.2	277	7	788	2123	61	3168	0.108	0.249		
7	D	〃	2013.2	264	26	980	1016	59	10460	0.446	0.094		
8	B	〃	2013.3	188	4	1225	1114	191	10506		0.117		
9	C	〃	2013.3	161	13	582	2251	35	2345	0.376	0.248		
10	B	〃	2013.12	1210		2362	3795	8	11510		0.205		
11	C	〃	2013.12	378	7	584	2740	48	3231	0.137	0.181		
12	D	〃	2013.12	611	150	932	2350	537	3663	0.279	0.254		
13	B	〃	2014.1	724		7713	3200	14	23107		0.334		
14	C	〃	2014.1	1145		1804	3020	20	6313		0.286		
15	D	〃	2014.1	724		896	1480	34	6700		0.134		
16	B	放流水	2012.12	194			1254		82				0.103
17	C	〃	2012.12	207			2713		69				
18	D	〃	2012.12	164		78	1021		1069		0.073		
19	B	〃	2013.1	134			1969		36				
20	C	〃	2013.1	135			2795						
21	C	〃	2013.2	134			1189						
22	D	〃	2013.2	134			1206	104	301				
23	B	〃	2013.3	509			2957		9				
24	C	〃	2013.3	220			2005		73				
25	B	〃	2013.12	611		4	2890		28		0.141		
26	C	〃	2013.12	451			3260		6				
27	D	〃	2013.12	405		54	1935		610		0.088		
28	B	〃	2014.1	480			3200		22				
29	C	〃	2014.1	495			3835		10				
30	D	〃	2014.1	369		57	1735		522		0.108		

FCV定量値の平均値

区分	本試験	対照試験	本試験/対照試験の比
流入水	475.7	2194.1	0.22
放流水	380.8	2421.2	0.16
全体	425.7	2313.6	0.18

表17. 感染性推定推定遺伝子検査法を用いた下水のノロウイルス定量結果（対数変換値）

番号	検体名	種類	採水年月	定量値(1ml当たり)						実測値に基づく減少率			
				本試験			対照試験			本試験/対照試験の比		本試験/対照試験の比の平均	
				FCV	GI	GII	FCV	GI	GII	GI	GII	GI	GII
1	B	流入水	2012.12	2.38	1.66	3.73	3.18	2.69	4.54	−1.027	−0.813	−0.843	−0.737
2	C	〃	2012.12	2.50	2.35	3.79	2.80	2.78	4.47	−0.423	−0.679	*0.143*	*0.183*
3	D	〃	2012.12	2.24	1.16	3.51	3.00	1.84	4.42	−0.678	−0.910		
4	B	〃	2013.1	2.65	1.32	3.71	3.24	1.65	4.50	−0.330	−0.789		
5	C	〃	2013.1	2.46	2.05	3.81	2.99	2.52	4.58	−0.467	−0.771		
6	C	〃	2013.2	2.44	0.82	2.90	3.33	1.79	3.50	−0.967	−0.604		
7	D	〃	2013.2	2.42	1.42	2.99	3.01	1.77	4.02	−0.351	−1.028		
8	B	〃	2013.3	2.27	0.60	3.09	3.05	2.28	4.02	−1.685	−0.933		
9	C	〃	2013.3	2.21	1.12	2.76	3.35	1.54	3.37	−0.425	−0.606		
10	B	〃	2013.12	3.08		3.37	3.58	0.90	4.06	−0.903	−0.688		
11	C	〃	2013.12	2.58	0.82	2.77	3.44	1.68	3.51	−0.863	−0.743		
12	D	〃	2013.12	2.79	2.18	2.97	3.37	2.73	3.56	−0.554	−0.595		
13	B	〃	2014.1	2.86		3.89	3.51	1.15	4.36	−1.146	−0.477		
14	C	〃	2014.1	3.06		3.26	3.48	1.30	3.80	−1.301	−0.544		
15	D	〃	2014.1	2.86		2.95	3.17	1.53	3.83	−1.531	−0.874		
16	B	放流水	2012.12	2.29			3.10		1.91				−1.297
17	C	〃	2012.12	2.32			3.43		1.84				*0.050*
18	D	〃	2012.12	2.21		1.89	3.01		3.03		−1.139		
19	B	〃	2013.1	2.13			3.29		1.56				
20	C	〃	2013.1	2.13			3.45						
21	C	〃	2013.2	2.13			3.08						
22	D	〃	2013.2	2.13			3.08	2.02	2.48	−2.017	−2.479		
23	B	〃	2013.3	2.71			3.47		0.95				
24	C	〃	2013.3	2.34			3.30		1.86				
25	B	〃	2013.12	2.79		0.60	3.46		1.45		−0.851		
26	C	〃	2013.12	2.65			3.51		0.78				
27	D	〃	2013.12	2.61		1.73	3.29		2.79		−1.053		
28	B	〃	2014.1	2.68			3.51		1.34				
29	C	〃	2014.1	2.69			3.58		1.00				
30	D	〃	2014.1	2.57		1.75	3.24		2.72		−0.965		

FCV定量値の平均値

区分	本試験	対照試験	本試験/対照試験の比	比の実数変換値
流入水	2.6	3.2	−0.65	0.23
放流水	2.4	3.3	−0.9	0.13
全体	2.5	3.3	−0.77	0.17

表 18 感染性推定遺伝子検査法 1 を用いた

糞便中のノロウイルス定量結果(対数変換値 ,n=3)

検体	従来法	開発法
糞便1	9.0	8.0
糞便2	9.8	8.4
糞便3	9.3	8.3
糞便4	10.1	8.5
糞便5	9.2	8.3
糞便6	7.0	6.2
平均	9.1	7.9

従来法-開発法(対数):-1.14

従来法-開発法(実数):0.073

表 19-1 感染性推定遺伝子検査法 2 を用いた A 終末処理場の流入水および放流水中のノロウイルス定量結果(実数)

番号	種類	採水年月	定量値(1ml当たり)						実測値に基づく減少率			
			本試験			対照試験			本試験/対照試験の比		本試験/対照試験の比の平均	
			FCV	GI	GII	FCV	GI	GII	GI	GII	GI	GII
1	流入水	2012.11	185628	16046	1588220	600543	128119	5179886	0.125	0.307	0.645	0.427
2	〃	2012.12	255881	23026	2629714	670609	12700	6985800	1.813	0.376		
3	〃	2013.1	179434	38681	2095771	572026	88584	4945143	0.437	0.424		
4	〃	2013.11	176685	34876	375800	377363	184782	538566	0.189	0.698		
5	〃	2013.12	182258	17601	1843469	570820	24794	5750400	0.710	0.321		
6	〃	2014.1	237699	119588	561060	517271	199568	1289994	0.599	0.435		
7	放流水	2012.11	98647	0	0	690814	0	0			-	0.166
8	〃	2012.12	43365	0	1726	788509	0	10411		0.166		
9	〃	2013.1	66731	0	0	502260	0	5255				
10	〃	2013.11	60929	0	0	296023	26438	0				
11	〃	2013.12	48146	0	0	623689	12738	9399				
12	〃	2014.1	53846	0	0	705223	0	3931				

表 19-2 FCV 定量値の平均値

区分	本試験	対照試験	本試験/対照試験の比
流入水	202930.5	551438.6	0.37
放流水	61944.0	601086.2	0.10
全体	139581.9	564538.7	0.25

表 20-1 感染性推定遺伝子検査法 2 を用いた A 終末処理場の流入水および放流水中のノロウイルス定量結果（対数変換値）

番号	種類	採水年月	定量値(1ml当たり)						実測値に基づく減少率			
			本試験			対照試験			本試験/対照試験の比		本試験/対照試験の比の平均	
			FCV	GI	GII	FCV	GI	GII	GI	GII	GI	GII
1	流入水	2012.11	5.27	4.21	6.20	5.78	5.11	6.71	−0.902	−0.513	−0.350	−0.387
2	〃	2012.12	5.41	4.36	6.42	5.83	4.10	6.84	0.258	−0.424	*0.447*	*0.410*
3	〃	2013.1	5.25	4.59	6.32	5.76	4.95	6.69	−0.360	−0.373		
4	〃	2013.11	5.25	4.54	5.57	5.58	5.27	5.73	−0.724	−0.156		
5		2013.12	5.26	4.25	6.27	5.76	4.39	6.76	−0.149	−0.494		
6	〃	2014.1	5.38	5.08	5.75	5.71	5.30	6.11	−0.222	−0.362		
7	放流水	2012.11	4.99			5.84					−4.264	−3.017
8	〃	2012.12	4.64		3.24	5.90		4.02		−0.780	*0.000*	*0.001*
9	〃	2013.1	4.82			5.70		3.72		−3.721		
10	〃	2013.11	4.78			5.47	4.42		−4.422			
11	〃	2013.12	4.68			5.79	4.11	3.97	−4.105	−3.973		
12		2014.1	4.73			5.85		3.59		−3.594		

表 20-2 FCV 定量値の平均値

区分	本試験	対照試験	本試験/対照試験の比	比の実数変換値
流入水	5.3	5.7	−0.43	0.37
放流水	4.8	5.8	−0.98	0.10
全体	5.0	5.7	−0.71	0.20

表 21-1 感染性推定遺伝子検査法 2 を用いた B 終末処理場の流入水および放流水中のノロウイルス定量結果（実数）

番号	種類	採水年月	定量値(1ml当たり)						実測値に基づく減少率			
			本試験			対照試験			本試験/対照試験の比		本試験/対照試験の比の平均	
			FCV	GI	GII	FCV	GI	GII	GI	GII	GI	GII
1	流入水	2012.11	295254	0	2278814	787197	0	4974829		0.458	0.344	0.406
2	〃	2012.12	188213	19664	1575671	715526	568226	3788686	0.035	0.416		
3	〃	2013.1	223422	178513	559014	590617	439311	1855243	0.406	0.301		
4	〃	2013.11	248403	0	118319	725577	0	350154		0.338		
5	〃	2013.12	290660	0	290669	559997	0	907271		0.320		
6	〃	2014.1	222338	36172	1045763	635754	61187	1732963	0.591	0.603		
7	放流水	2012.11	97026	0	1547	660437	0	1764		0.877	−	0.877
8	〃	2012.12	40379	0	0	670589	20837	4110				
9	〃	2013.1	42199	0	0	595329	23440	2870				
10	〃	2013.11	32491	0	0	661503	0	0				
11	〃	2013.12	45996	0	0	591020	0	1370				
12	〃	2014.1	56437	0	0	615606	0	7213				

表 21-2 FCV 定量値の平均値

区分	本試験	対照試験	本試験/対照試験の比
流入水	244715.0	669111.4	0.37
放流水	52421.4	632413.8	0.08
全体	156943.7	653958.7	0.24

表 22-1 感染性推定遺伝子検査法 2 を用いた B 終末処理場の流入水および放流水中のノロウイルス定量結果（対数変換値）

番号	種類	採水年月	定量値(1ml当たり)						実測値に基づく減少率			
			本試験			対照試験			本試験/対照試験の比		本試験/対照試験の比の平均	
			FCV	GI	GII	FCV	GI	GII	GI	GII	GI	GII
1	流入水	2012.11	5.47		6.36	5.90		6.70		−0.339	−0.693	−0.404
2	〃	2012.12	5.27	4.29	6.20	5.85	5.75	6.58	−1.461	−0.381	*0.203*	*0.394*
3	〃	2013.1	5.35	5.25	5.75	5.77	5.64	6.27	−0.391	−0.521		
4	〃	2013.11	5.40		5.07	5.86		5.54		−0.471		
5		2013.12	5.46		5.46	5.75		5.96		−0.494		
6	〃	2014.1	5.35	4.56	6.02	5.80	4.79	6.24	−0.228	−0.219		
7	放流水	2012.11	4.99		3.19	5.82		3.25		−0.057	−4.344	−2.825
8	〃	2012.12	4.61			5.83	4.32	3.61	−4.319	−3.614	*0.000*	*0.001*
9	〃	2013.1	4.63			5.77	4.37	3.46	−4.370	−3.458		
10	〃	2013.11	4.51			5.82						
11	〃	2013.12	4.66			5.77		3.14		−3.137		
12		2014.1	4.75			5.79		3.86		−3.858		

表 22-2 FCV 定量値の平均値

区分	本試験	対照試験	本試験/対照試験の比	比の実数変換値
流入水	5.4	5.8	−0.44	0.36
放流水	4.7	5.8	−1.11	0.08
全体	5.0	5.8	−0.77	0.17

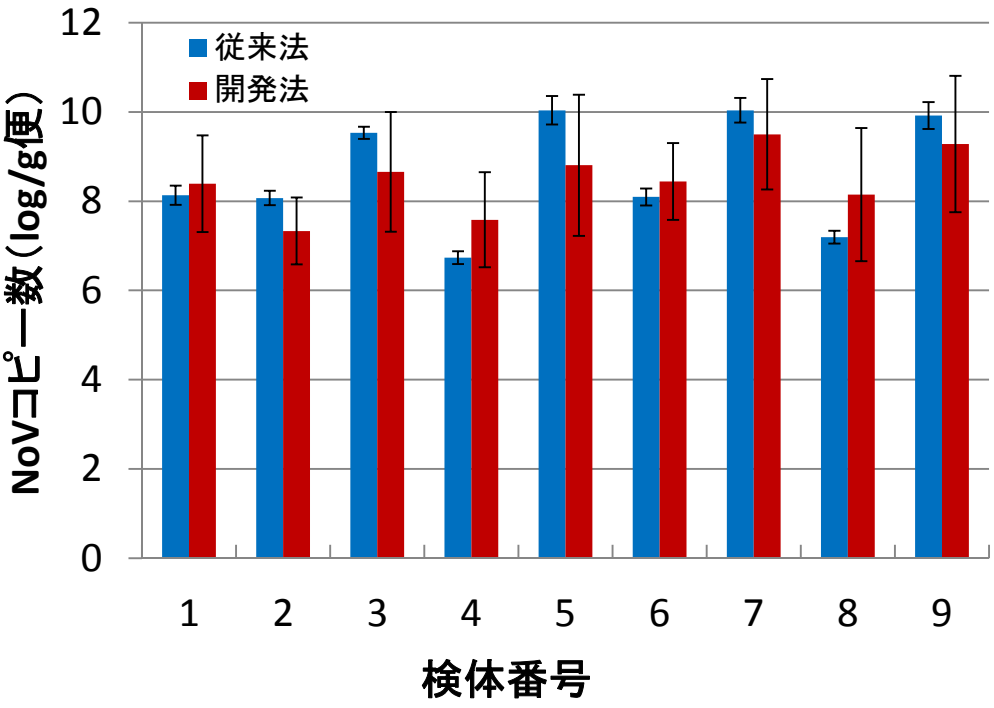


図64　患者新鮮糞便における対照試験1と本試験のノロウイルス定量値

表23　感染性推定推定遺伝子検査法を用いた下水のノロウイルス定量結果（対数変換値）

番号	種類	採水年月	定量値(1ml当たり)				実測値に基づく減少率			
			本試験		対照試験1		本試験/対照試験1の比		本試験/対照試験1の比の平均	
			GI	GII	GI	GII	GI	GII	GI	GII
1	流入水	2011.3	3.21	2.97	3.89	3.80	−0.675	−0.833	−0.608	−0.716
2		2011.3	3.00	2.84	3.61	3.55	−0.616	−0.703	*0.247*	*0.192*
3		2011.4	2.55	2.72	3.07	3.20	−0.514	−0.487		
4		2011.4	2.50	2.53	3.12	3.38	−0.626	−0.843		
5	放流水	2011.3	1.36	1.03	2.33	1.94	−0.962	−0.915	−1.042	−1.015
6		2011.3	0.80	0.62	2.24	1.85	−1.439	−1.231	*0.091*	*0.097*
7		2011.4	0.73	0.62	1.58	1.64	−0.848	−1.016		
8		2011.4	1.04	0.49	1.96	1.39	−0.920	−0.899		

注）斜体の値は実数変換値

表24-1　感染性推定推定遺伝子検査法を用いた下水のノロウイルス定量結果（実数）

番号	種類	採水年月	定量値(1ml当たり)						実測値に基づく減少率			
			本試験			対照試験2			本試験/対照試験2の比		本試験/対照試験2の比の平均	
			FCV	GI	GII	FCV	GI	GII	GI	GII	GI	GII
11	流入水	2012.12	14696.99	130.99	16086.94	20939.58	152.64	24521.09	0.858	0.656	0.765	0.869
12		2013.1	10388.85	325.27	10503.54	18641.67	239.15	6273.43	1.360	1.674		
13		2013.2	7451.54	22.68	10333.51	14353.45	46.64	14196.54	0.486	0.728		
14		2013.11	10674.89	0.00	800.82	27627.01	0.329	1543.42	0.000	0.519		
15		2013.12	14349.44	328.97	5412.88	22167.92	293.05	7045.44	1.123	0.768		
16	放流水	2012.12	5885.35	0.68	78.61	22146.59	2.69	313.80	0.251	0.251	0.232	0.315
17		2013.1	6797.42	7.66	250.73	14130.54	14.88	654.52	0.515	0.383		
18		2013.2	6329.73	1.80	418.93	16578.24	11.00	902.93	0.164	0.464		
19		2013.11	3852.45	0.00	60.16	36094.73	0.00	144.01		0.418		
20		2013.12	3142.73	0.00	5.34	41493.25	14.69	92.86	0.000	0.057		

表24-2 FCV定量値の平均値

区分	本試験	対照試験2	本試験/対照試験2の比
流入水	11512.3	20745.9	0.55
放流水	5201.5	26088.7	0.20
全体	8356.9	23417.3	0.36

表25-1 感染性推定推定遺伝子検査法を用いた下水のノロウイルス定量結果(対数変換値)

番号	種類	採水年月	定量値(1ml当たり)						実測値に基づく減少率			
			本試験			対照試験2			本試験/対照試験2の比		本試験/対照試験2の比の平均	
			FCV	GI	GII	FCV	GI	GII	GI	GII	GI	GII
11		2012.12	4.17	2.12	4.21	4.32	2.18	4.39	−0.066	−0.183	0.057	−0.099
12		2013.1	4.02	2.51	4.02	4.27	2.38	3.80	0.134	0.224	*1.141*	*0.796*
13	流入水	2013.2	3.87	1.36	4.01	4.16	1.67	4.15	−0.313	−0.138		
14		2013.11	4.03		2.90	4.44	−0.48	3.19	0.482	−0.285		
15		2013.12	4.16	2.52	3.73	4.35	2.47	3.85	0.050	−0.114		
16		2012.12	3.77	−0.17	1.90	4.35	0.43	2.50	−0.600	−0.601	−0.710	−0.594
17		2013.1	3.83	0.88	2.40	4.15	1.17	2.82	−0.288	−0.417	*0.195*	*0.255*
18	放流水	2013.2	3.80	0.26	2.62	4.22	1.04	2.96	−0.785	−0.334		
19		2013.11	3.59		1.78	4.56		2.16		−0.379		
20		2013.12	3.50		0.73	4.62	1.17	1.97	−1.167	−1.240		

注)斜体の値は実数変換値

表25-2 FCV定量値の平均値

区分	本試験	対照試験2	本試験/対照試験2の比	比の実数変換値
流入水	4.0	4.3	−0.26	0.55
放流水	3.7	4.4	−0.68	0.21
全体	3.9	4.3	−0.47	0.34

表 26 感染性推定遺伝子検査法を用いた糞便におけるノロウイルスの定量値

番号	定量値(log10/g)	
	開発法	従来法
1	7.83	8.09
2	8.77	9.17
3	10.25	10.41
4	7.21	7.34
5	9.59	9.77
6	10.18	10.85
7	9.37	9.58
平均	9.03	9.32
開発法/従来法の比	0.97	

表 27　開発法および従来法を用いた下水のノロウイルス定量結果（対数変換値）

番号	検体名	種類	採水年月	定量値（log10/ml）				糞便（平均値）で補正			
				開発法		従来法		開発法		開発法/従来法の比	
				GI	GII	GI	GII	GI	GII	GI	GII
1	Hw10-3cp	流入水	2010/2/3	3.98	4.15	3.12	3.74	4.11	4.27	0.99	0.54
2	Yw10-2cp	〃	2010/2/15	3.29	4.60	1.94	3.29	3.39	4.74	1.46	1.45
3	Hw10-4cp	〃	2010/2/15	3.98	4.26	3.16	3.48	4.10	4.39	0.94	0.91
4	OR1115	〃	2012/11/15		2.85		3.88		2.94		−0.94
5	OR1126	〃	2012/11/26				3.47				
6	TR1127	〃	2012/11/27	2.21	4.77	1.93	4.09	2.28	4.92	0.35	0.82
7	OR1203	〃	2012/12/3		2.65	2.40	3.48		2.73		−0.76
8	OR1217	〃	2012/12/17		3.64	1.49	4.04		3.75		−0.29
9	TR1225	〃	2012/12/25	3.38	4.76	2.27	3.88	3.48	4.91	1.21	1.03
10	OR0107	〃	2013/1/7		4.26		4.00		4.39		0.39
11	OR0121	〃	2013/1/21	1.61	2.70	2.12	3.92	1.66	2.79	−0.46	−1.13
12	TR0122	〃	2013/1/22	1.82	2.71	2.65	3.63	1.88	2.79	−0.77	−0.84
13	OR0204	〃	2013/2/4		1.26	1.95	3.96		1.30		−2.67
14	OH0204	〃	2013/2/4			1.04	2.19				
流入水の平均値				2.90	3.55	2.19	3.65	2.99	3.66	0.80	0.01
15	OH1115	放流水	2012/11/15								
16	OH1126	〃	2012/11/26				1.63				
17	OH1203	〃	2012/12/3			1.90	1.65				
18	OH1217	〃	2012/12/17		1.72		1.82		1.78		−0.05
19	OH0107	〃	2013/1/7				1.90				
20	OH0121	〃	2013/1/21			1.28	2.72				
放流水の平均値					1.72	1.59	1.94		1.78		−0.17
糞便で得られた補正値				0.97							

表 28　感染性推定遺伝子検査法を用いた下水のノロウイルス定量結果（実数）

番号	検体名	種類	採水年月	定量値(1ml 当たり)						実測値に基づく減少率			
				本試験			対照試験			本試験/対照試験の比		本試験/対照試験の比の平均	
				FCV	GI	GII	FCV	GI	GII	GI	GII	GI	GII
1	OR0107	流入水	2013/1/7	1050		283	7187	20	5091		0.056	0.150	0.085
2	OR0121	〃	2013/1/21	1041	9	618	4828	123	5337	0.070	0.116		
3	OR0204	〃	2013/2/4	735		197	5932	23	4453		0.044		
4	OR0226	〃	2013/2/26	1115		849	8331	20	16296		0.052		
5	OR1115	〃	2012/11/15	775		103	7447		1705		0.060		
6	OR1126	〃	2012/11/26	1218		77	5889	14	1050		0.074		
7	OR1203	〃	2012/12/3	1467	237	260	7630	1018	1456	0.233	0.179		
8	OR1217	〃	2012/12/17	1510	6	263	6727	117	6824	0.049	0.039		
9	TR1225	〃	2012/12/25	1808	395	1356	7064	1599	9329	0.247	0.145		
10	OH0107	放流水	2013/1/7	312			11011						0.041
11	OH0121	〃	2013/1/21	501		9	8305	29	320		0.027		
12	OH0204	〃	2013/2/4	506		3	8351	17	109		0.026		
13	OH0226	〃	2013/2/26	1087		23	15767	6	326		0.070		
14	OH1115	〃	2012/11/15	432			11185						
15	OH1126	〃	2012/11/26	418			14400						
16	OH1203	〃	2012/12/3	386			10122	6	9				
17	OH1217	〃	2012/12/17	469			10345	3	37				

FCV 定量値の平均値

区分	本試験	対照試験	本試験/対照試験の比
流入水	1191.0	6781.7	0.18
放流水	513.7	11185.8	0.05
全体	872.3	8854.2	0.10

表 29　感染性推定遺伝子検査法を用いた下水のノロウイルス定量結果（対数変換値）

番号	検体名	種類	採水年月	定量値(1ml 当たり)						実測値に基づく減少率			
				本試験			対照試験			本試験/対照試験の比		本試験/対照試験の比の平均	
				FCV	GI	GII	FCV	GI	GII	GI	GII	GI	GII
1	OR0107	流入水	2013/1/7	3.02		2.45	3.86	1.30	3.71		−1.255	−0.927	−1.131
2	OR0121	〃	2013/1/21	3.02	0.93	2.79	3.68	2.09	3.73	−1.156	−0.936	*0.118*	*0.074*
3	OR0204	〃	2013/2/4	2.87		2.30	3.77	1.36	3.65		−1.353		
4	OR0226	〃	2013/2/26	3.05		2.93	3.92	1.30	4.21		−1.283		
5	OR1115	〃	2012/11/15	2.89		2.01	3.87		3.23		−1.219		
6	OR1126	〃	2012/11/26	3.09		1.89	3.77	1.16	3.02		−1.133		
7	OR1203	〃	2012/12/3	3.17	2.38	2.42	3.88	3.01	3.16	−0.632	−0.748		
8	OR1217	〃	2012/12/17	3.18	0.76	2.42	3.83	2.07	3.83	−1.312	−1.414		
9	TR1225	〃	2012/12/25	3.26	2.60	3.13	3.85	3.20	3.97	−0.608	−0.838		
10	OH0107	放流水	2013/1/7	2.49			4.04						−1.435
11	OH0121	〃	2013/1/21	2.70		0.93	3.92	1.46	2.51		−1.572		*0.037*
12	OH0204	〃	2013/2/4	2.70		0.46	3.92	1.23	2.04		−1.580		
13	OH0226	〃	2013/2/26	3.04		1.36	4.20	0.76	2.51		−1.154		
14	OH1115	〃	2012/11/15	2.64			4.05						
15	OH1126	〃	2012/11/26	2.62			4.16						
16	OH1203	〃	2012/12/3	2.59			4.01	0.76	0.93				
17	OH1217	〃	2012/12/17	2.67			4.01	0.46	1.57				

斜体の値は実数変換値

FCV 定量値の平均値

区分	本試験	対照試験	本試験/対照試験の比	比の実数変換値
流入水	3.1	3.8	−0.77	0.17
放流水	2.7	4.0	−1.36	0.04
全体	2.9	3.9	−1.05	0.09

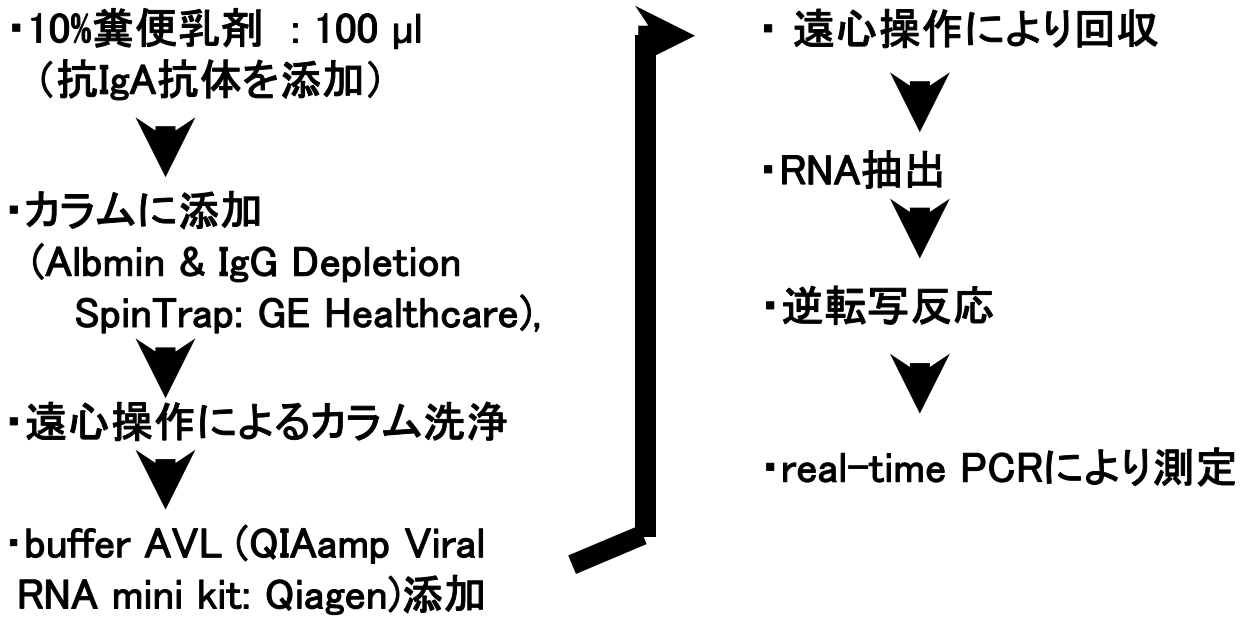


図65　ウイルス-抗体複合体回収のながれ

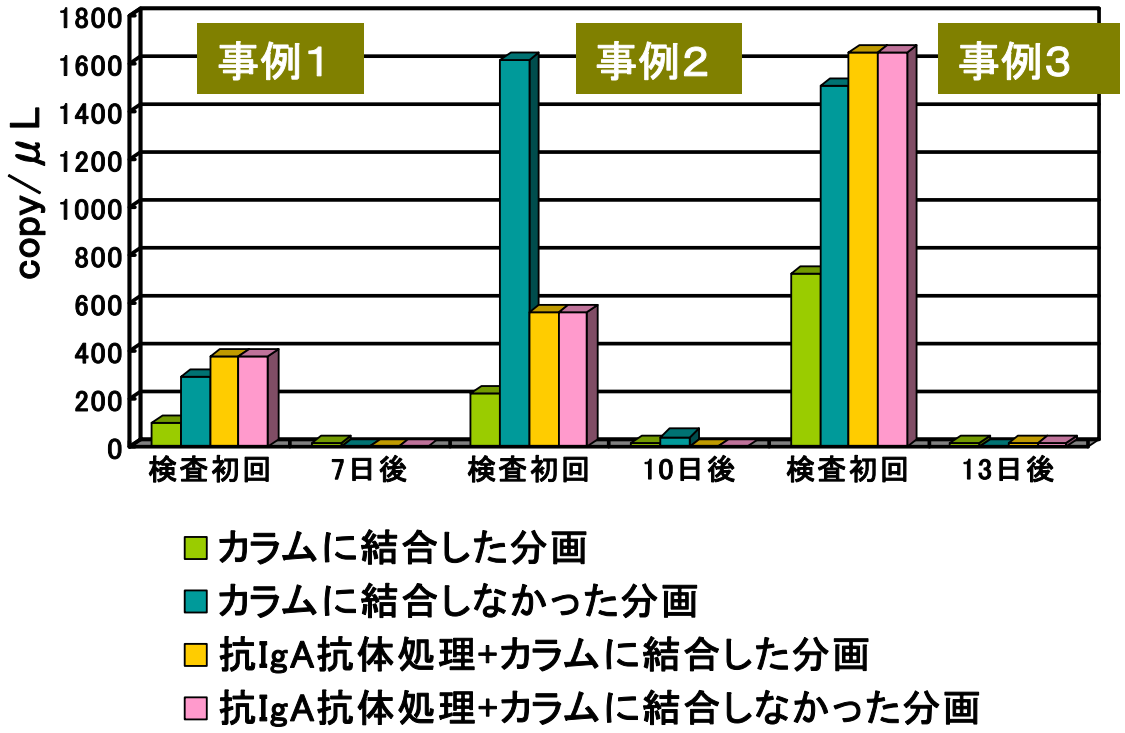


図66　複数回ウイルス検出例におけるウイルス-抗体複合体の検索

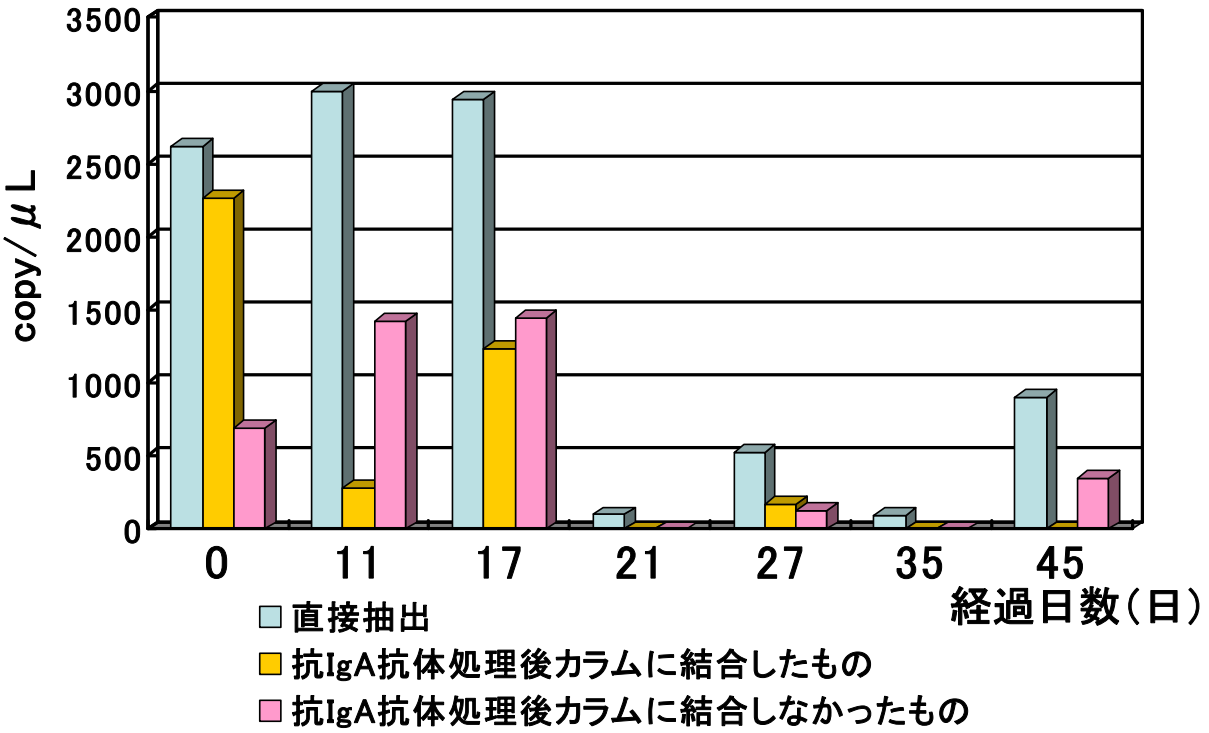


図67　長期ウイルス検出例におけるウイルス-抗体複合体の検索

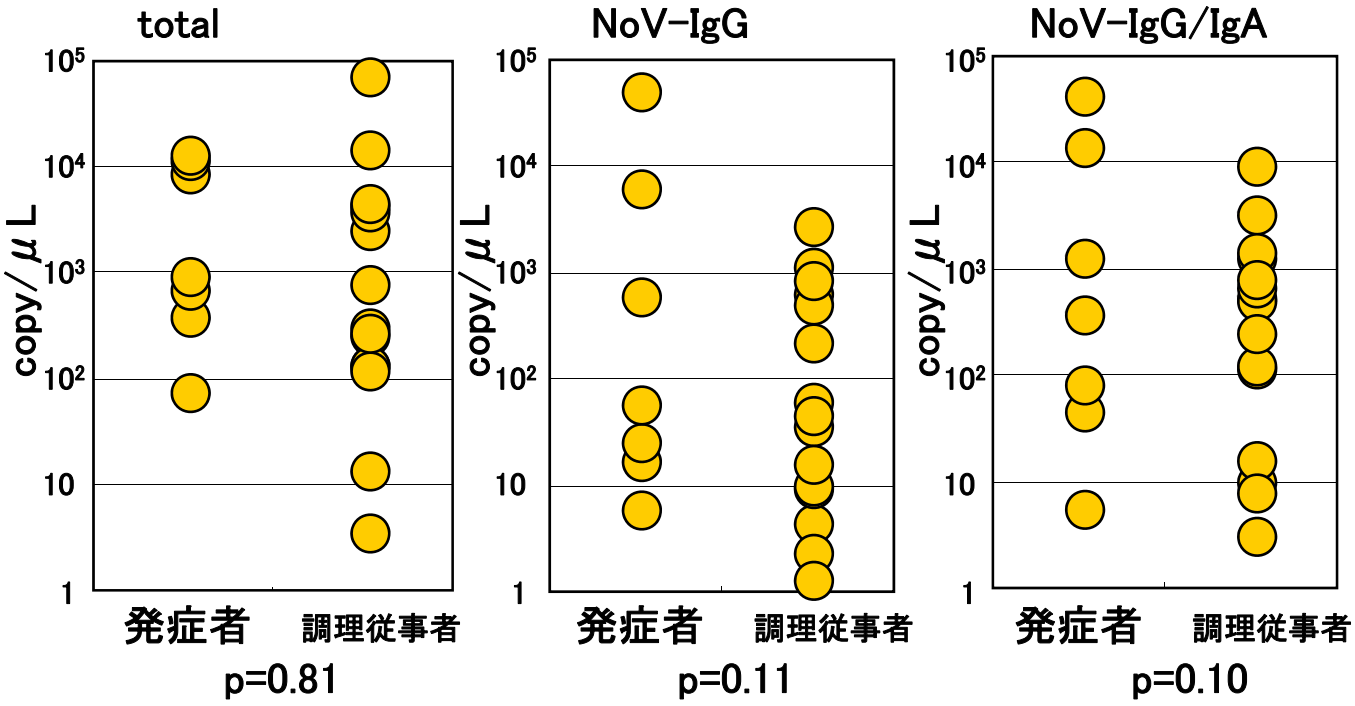


図68　発症者と調理従事者におけるウイルス-抗体複合体の検索

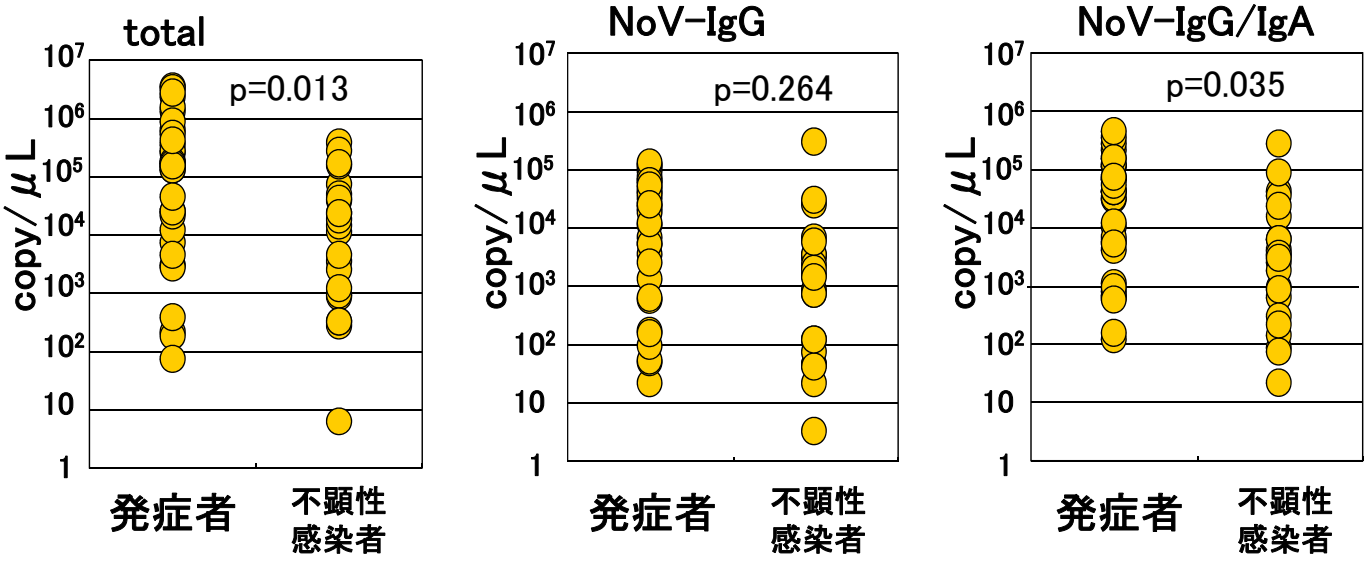


図69　発症者と不顕性感染者におけるウイルス-抗体複合体の検索

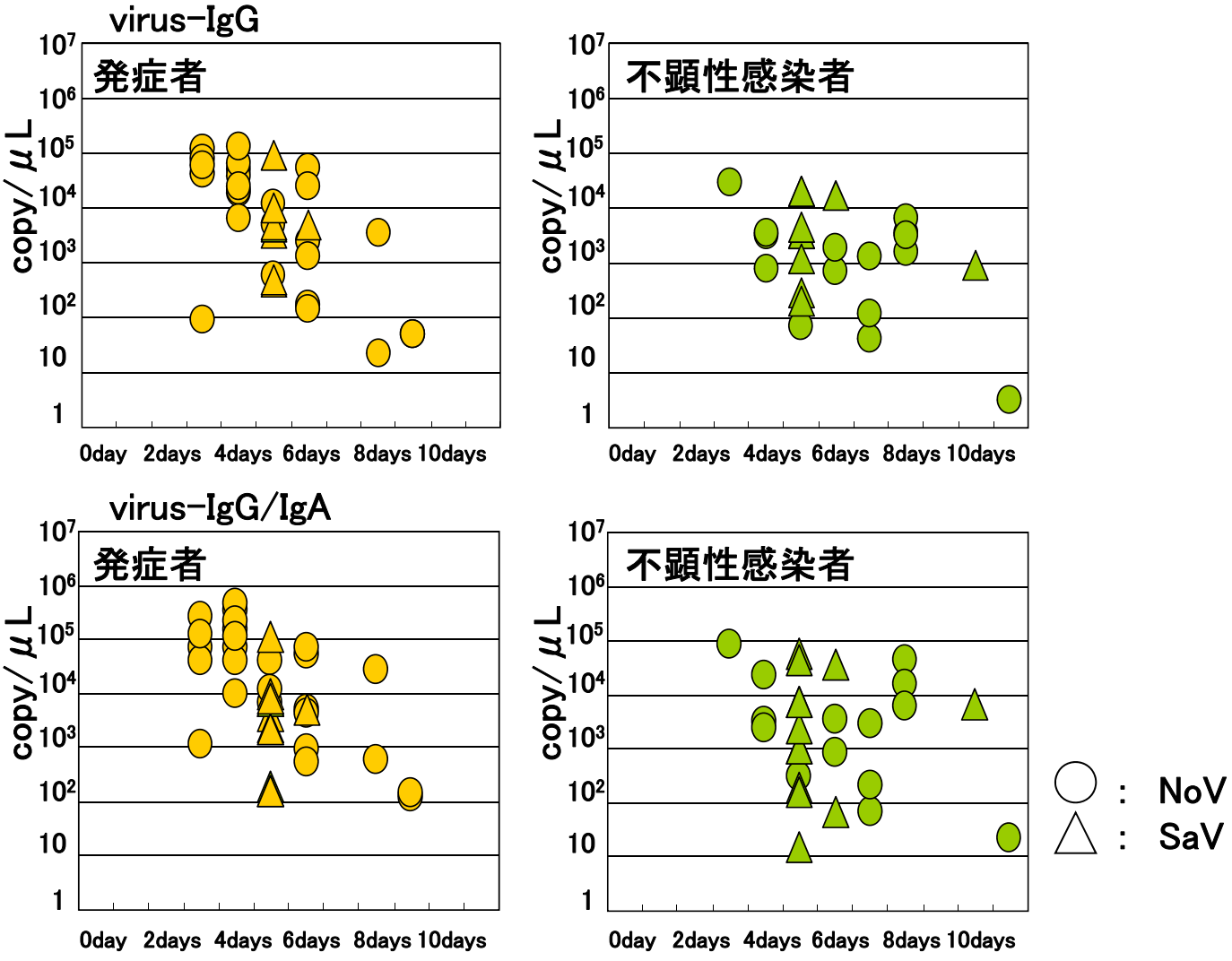


図70　喫食後の時間経過とウイルス-抗体複合体の分布

表30　パンソルビン吸収法による抗体被覆粒子と非被覆粒子の定量値

検体番号	性別.年齢	発病後採取日までの日数	遺伝子型	糞便1g当たりのコピー数					抗体被覆粒子の割合	
				全体(直接定量)	IgA+IgG被覆粒子	IgA+IgG非被覆粒子	IgG被覆粒子	IgG非被覆粒子	IgA+IgG被覆粒子	IgG被覆粒子
13-1195	M.14	2	GII/2	2.6E+08	9.1E+07	3.5E+07	2.3E+06	1.6E+08	72.22%	1.42%
13-513	F.1	3	GII/4	3.5E+05	1.2E+05	2.0E+05		1.5E+06	37.50%	0.00%
13-1136	F.7	2	GII/2	3.8E+09	5.5E+08	1.5E+09	1.5E+08	2.1E+09	26.83%	6.67%
667	F.6	3	GII/6	6.5E+09	8.1E+08	5.0E+09	5.8E+08	7.2E+09	13.94%	7.46%
13-14	M.7	2	GII/12	3.1E+09	1.7E+08	2.7E+09	4.6E+07	2.5E+09	5.92%	1.81%
12-09	F.5	2	GII/4	1.9E+05	6.0E+04	1.3E+06		6.0E+05	4.41%	0.00%
13-1134	M.1	5	GII/2	1.4E+09	4.0E+07	1.4E+09	1.7E+07	1.6E+09	2.78%	1.05%
535	F.6	2	GII/7	1.1E+08	1.3E+06	8.4E+07	1.5E+06	1.0E+08	1.52%	1.48%
694	M.1	2	GII/2	2.6E+09	3.0E+07	3.0E+09	1.2E+07	2.8E+09	0.99%	0.43%
674	M.2	3	GII/13	1.1E+09	1.2E+07	1.2E+09	1.4E+06	1.2E+09	0.99%	0.12%
12-523	F.0.8	8	GII/13	1.9E+09	4.3E+06	1.2E+09	2.5E+06	1.5E+09	0.36%	0.17%
144	F.6	2	GII/6	1.3E+09	2.1E+06	1.4E+09	2.4E+06	1.6E+09	0.15%	0.15%
11-54	F.8	8	GII/13	2.0E+08	1.4E+05	1.6E+08	3.0E+04	1.8E+08	0.09%	0.02%
1134	F.1	7	GII/4	8.2E+08	7.0E+05	1.1E+09	6.8E+05	1.1E+09	0.06%	0.06%
249	F.6	8	GII/13	6.5E+08	1.9E+05	3.7E+08		5.3E+08	0.05%	0.00%
444	M.5	2	GII/2	6.4E+08	2.5E+05	7.0E+08	3.1E+06	8.9E+08	0.04%	0.35%
1316	F.2	7	GII/4	6.5E+09	3.7E+05	2.2E+09	3.3E+05	1.9E+09	0.02%	0.02%
13-12	M.1	2	GII/4	3.5E+07		4.2E+07		3.8E+07	0.00%	0.00%
1041	F.1	11	－	3.4E+05		1.8E+05		2.8E+05	0.00%	0.00%

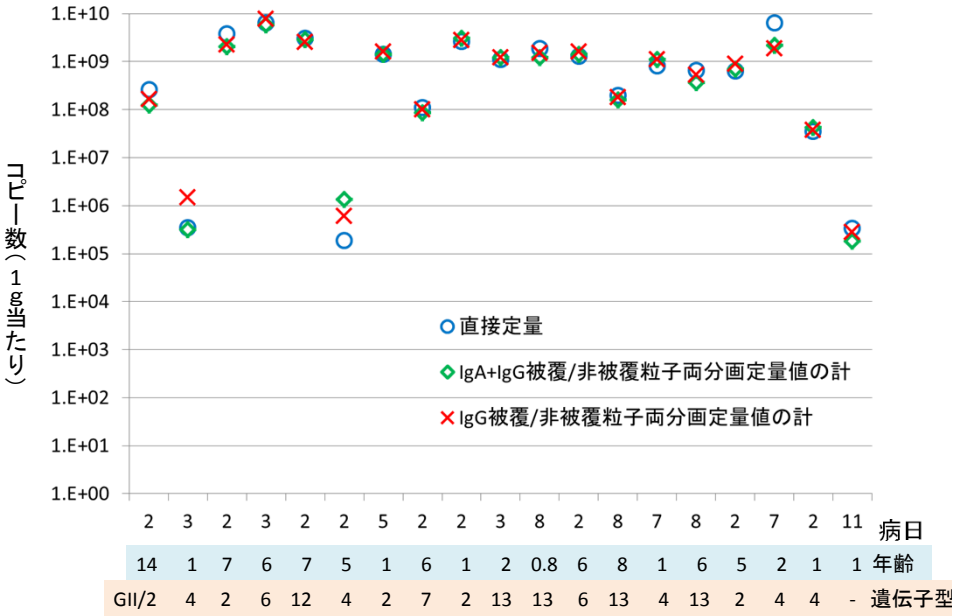


図71　糞便中のノロウイルスRNAの直接定量値と分画後定量値の比較

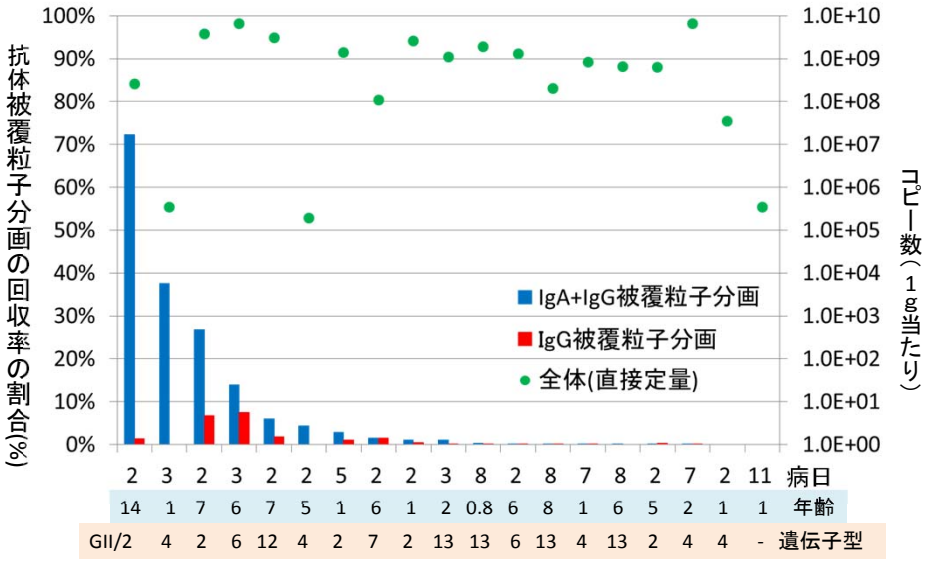


図72　抗体被覆粒子分画の回収率および糞便中のウイルスRNA量

表31　胃腸炎患者糞便中の抗体被覆ウイルスと抗体非被覆ウイルスの定量値

	検体の由来（年齢･性別･採取病日･遺伝子型）	食中毒疑い患者検体					散発性感染性胃腸炎患者検体		
		検体1 成人･男 6･GII.4	検体2 成人･女 6･GII.4	検体3 成人･男 7･GII.4	検体4 成人･男 7･GII.4	検体5 成人･女 5･GII.4	検体6 2･男 2･GII.2	検体7 1･男 4･GII.4	検体8 4･男 4･GII.4
1	糞便中のNoV量	6.4x10E5	6.4x10E4	1.4x10E6	3.7x10E5	4.3x10E5	2.2x10E6	1.3x10E6	2.5x10E5
2	IgG被覆NoV量	1.6x10E5	1.3x10E4	1.2x10E4	1.4x10E4	1.7x10E4	1.0x10E4	8.3x10E4	1.1x10E4
3	IgG非被覆NoV量	2.4x10E5	5.1x10E4	8.8x10E5	3.6x10E5	4.4x10E5	2.2x10E6	1.2x10E6	2.0x10E5
4	IgA＋IgG被覆NoV量	5.2x10E4	2.0x10E4	3.8x10E5	1.7x10E4	6.9x10E4	4.9x10E4	8.9x10E4	1.5x10E4
5	IgA＋IgG非被覆NoV量	1.9x10E5	4.0x10E4	6.8x10E5	3.4x10E5	3.4x10E5	1.1x10E6	8.9x10E5	1.5x10E5

図73　検体中の全ウイルス量及び抗体被覆と非被覆総ウイルス量の比較

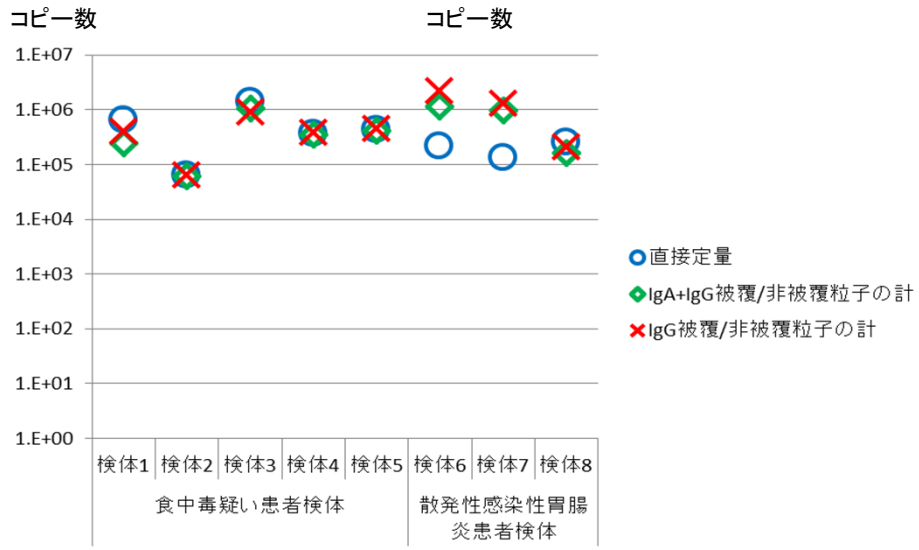


図74　検体中の抗体被覆ウイルスの占有割合とウイルス量

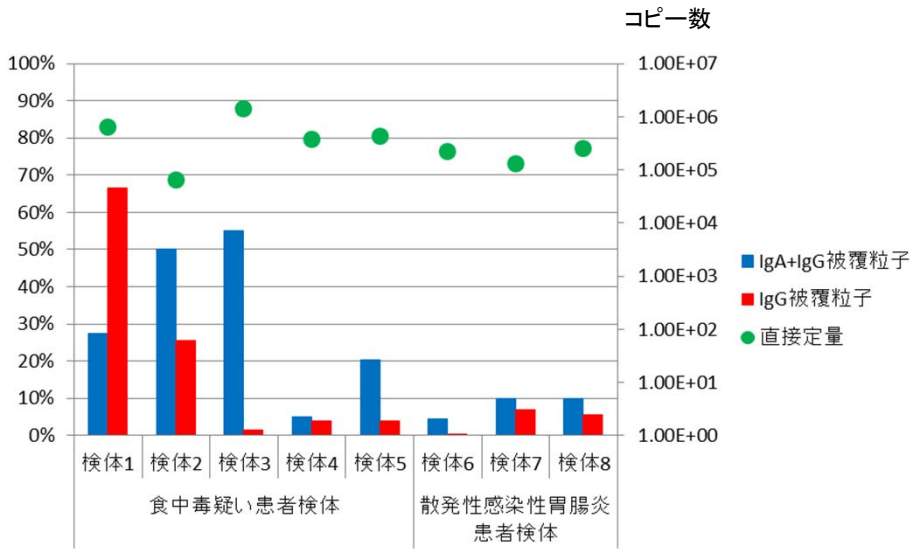
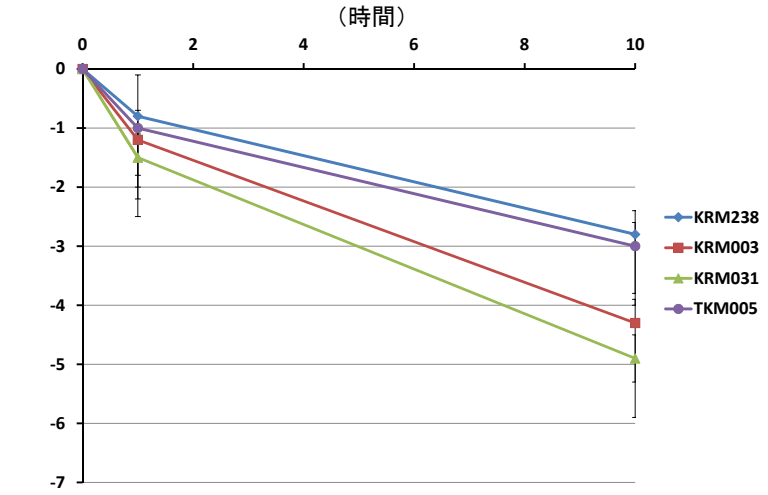


図75　HAVの加熱による不活化



（titerの減少）

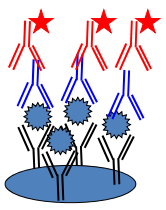
図76　HEV-Agの検出方法: ELISA

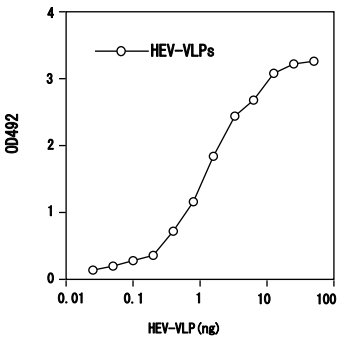
A. ウサギ抗HEV-G1-VLP抗体

B. モルモット抗HEV-G1-VLP抗体

C. 山羊抗モルモットIgG-HRP

HEV-Ag





ELISA法の感度（0.5ng/ml）

図77　HEVの熱安定性(1)

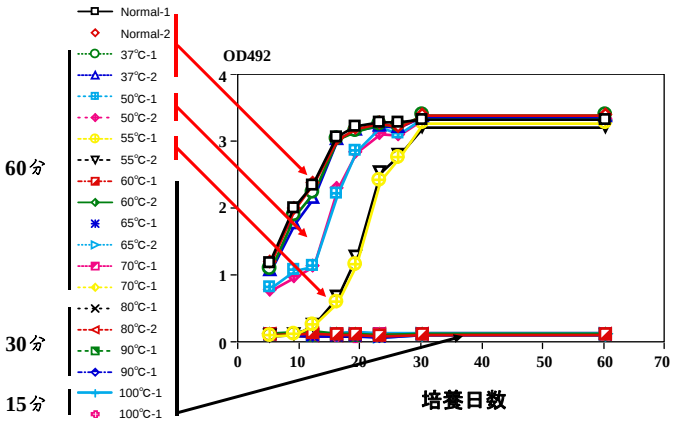


図78　HEVの熱安定性(2)

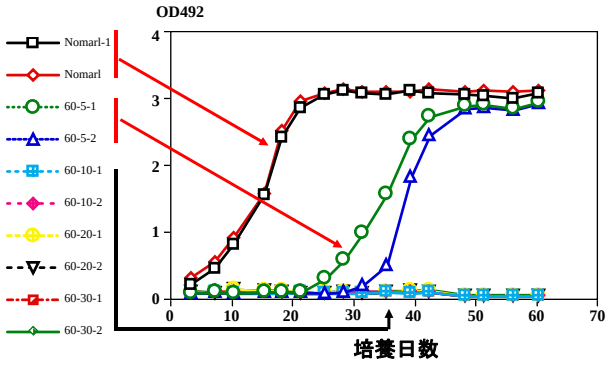
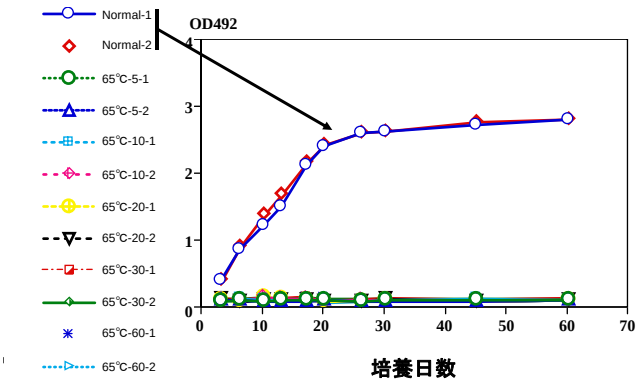


図79　HEVの熱安定性(3)



Ⅲ　本研究を基に発表した論文等

１　本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名のリスト

野田　衛：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，2013

２　本研究を基にした学会発表の実績

溝口嘉範，磯田美穂子，木田浩司，濱野雅子，藤井理津志，岸本壽男，安原広己，上間匡，野田　衛：感染性推定遺伝子検査法の下水中のノロウイルス検出への応用，第 106 回日本食品衛生学会学術講演会，宜野湾市，11/21-22，2013

上間　匡，三元昌美，青沼えり，野田　衛：ノロウイルスのリスク評価のための感染性推定遺伝子検査法の開発，第 106 回日本食品衛生学会学術講演会，宜野湾市，11/21-22，2013

上間　匡，三元昌美，青沼えり，栗原慶隆，野田　衛：ノロウイルスの感染性推定遺伝子検査の開発と応用，第 34 回日本食品微生物学会学術総会，江戸川区，10/3-4，2013

三元昌美，上間　匡，栗原慶隆，野田　衛：感染性推定遺伝子検査法を用いたノロウイルスの乾燥状態および液体中の生存性の推定，第 106 回日本食品衛生学会学術講演会，宜野湾市，11/21-22，2013

Koji Mori, Mamoru Noda, Yoshiko Somura, Yukinao Hayashi, and Akemi Kai : Comparison of the virus-antibody complex in fecal specimens from symptomatic and asymptomatic patients. The 5th international calicivirus conference, 2013, Beijing, China, 12 to 15, Oct., 2013.

３　特許及び特許出願の数と概要

なし。

４　その他（各種受賞，プレスリリース，開発ソフト・データベースの構築等）

なし。

Ⅳ　主任研究者による研究全体の自己評価

項目	評価結果	評価コメント
１　研究の妥当性	5	食品媒介ウイルスの多くは培養が困難か不可能であり，食品からの検出は遺伝子検査に頼らざるを得ない一方，非感染性ウイルスに由来する遺伝子も検出してしまうことから，食品におけるウイルス汚染のリスク評価を行う上で最大かつ共通の問題点となっている。本研究の目的は，食品からのウイルス検出に用いられている遺伝子検査法に改良を加え，感染性ウイルス粒子に由来する遺伝子のみを検出できる方法を開発することにある。本法で検出される遺伝子は必ずしも感染性ウイルスのみに由来するものではないが，従来の検査法と比較して，感染性をより反映できるものとなっている。食品のリスク評価を行う上での重要な課題を解決するための研究であり，研究内容の妥当性は極めて優れていると考える。
２　研究目標の達成度	4	本研究により，当初想定していた以上の感染性推定遺伝子検査法や抗体被覆粒子鑑別法を構築することができた。しかしながら，開発した感染性推定遺伝子検査法での定量値と感染価の関連性が今だ十分に明らかにできていない点および感染性推定遺伝子検査法と抗体被覆粒子鑑別法とが一連の検査法として確立できていない点が，目標達成には至っていない課題として残っている。
３　研究成果の有用性	5	本研究班で開発した感染性推定遺伝子検査法および抗体被覆粒子鑑別法を今後，食品，下水，施設のフキトリ等の環境材料，患者便・従事者便等の臨床材料からの検出に適用することにより，食品のウイルス汚染のリスク評価に必要な多くの，有用なデータを得ることができると考えられる。
合　計	19	

総合コメント

２年間という短時間の研究であったが，感染性推定遺伝子検査法の開発を行うことができ，また本法を利用して，リスクプロファイルに必要なデータの蓄積を図ることができた。今後，本法を広く普及させ，食品のウイルス汚染のリスク評価に必要なデータの蓄積に活用していきたい。さらに，より感染性ウイルス量を反映できるように検査法の改良にも努力したい。

注）評価結果欄は，「５」を最高点，「１」を最低点として５段階で記述する。