

平成24～25年度食品健康影響評価技術研究

「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」
(研究課題番号:1203)

日時:平成26年12月10日(水)

場所:内閣府食品安全委員会会議室

国立医薬品食品衛生研究所
食品衛生管理部
野田 衛

食品媒介性ウイルスのリスクプロファイルに不足するデータ

リスクプロファイル

カキを主とする二枚貝中のノロウイルス（平成18年10月作成）

食品中のノロウイルス（平成22年4月作成）

二枚貝におけるA型肝炎ウイルス（平成24年1月作成）

ブタ肉におけるE型肝炎ウイルス（平成24年1月作成）

用量反応曲線がほとんど存在しない。
食品の感染リスクに関するデータが不足。



HuNoV: 培養できない、HAV, HEV: 培養に長時間必要→
食品からの検出: 遺伝子検査

遺伝子検査: 必ずしも感染性ウイルスを検出している訳ではない

食品媒介性ウイルスのリスク評価を実施する上での
最大かつ共通の課題

研究目的

食品等のウイルス汚染の正確なリスク評価を可能にするために、感染性ウイルス量を反映する次世代の標準的遺伝子検査法を確立する。開発した方法を用いて、食品媒介ウイルスのリスク評価に必要なデータを得る。

感染性推定遺伝子検査法の利用

カキ等の汚染食品

感染リスク評価
汚染実態調査
モニタリング
自主検査・行政検査
規格基準

汚染環境のリスク

残存ウイルスの感染リスク
施設環境の衛生管理

糞便中のウイルス

長期間排出例
顕性感染者と不顕性感染者
調理従事者の職場復帰

下水、海水中のウイルス

下水処理の効果(判定)
下水の汚染リスク
海水での生存性
モニタリング

殺菌剤等の有効性評価

研究内容、分担研究者、研究期間

研究項目名	個別課題名	担当者	研究期間	
			H24	H25
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	○	○
	感染性推定遺伝子検査法の有用性の評価	上間 匡	○	○
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 地方衛生研究所 等	○	○
	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 地方衛生研究所 等	○	○
A型肝炎ウイルスの生存性、不活化条件	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	○	中止
E型肝炎ウイルスの生存性、不活化条件	E型肝炎ウイルス 抗原検出系の樹立	李 天成	○	
	E型肝炎ウイルスの熱安定性の検討			
	E型肝炎ウイルスの消毒剤に対する抵抗性			
E型肝炎ウイルスの紫外線に対する抵抗性				

研究協力者

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有用性の評価	野田 衛(国立医薬品食品衛生研究所) 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	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) 栞原慶隆, 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	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) 吉富秀亮, 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	A型肝炎ウイルスの生存性, 不活化条件	塩田智之(国立感染症研究所)

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載

目標としている感染性推定遺伝子検査法

鑑別対照

抗体の被覆の有無

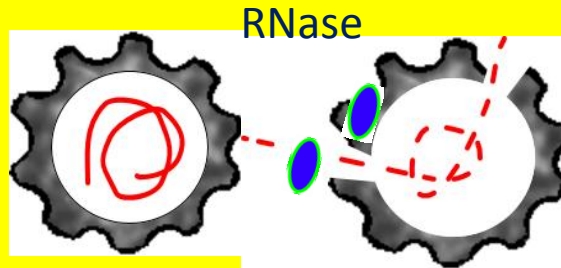


鑑別方法

プロテインGカラム処理
パンソルビン処理

ウイルス蛋白の変性・破壊

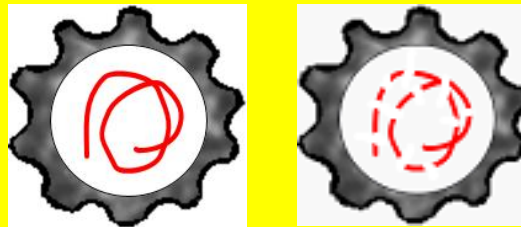
加熱、乾燥、消毒剤



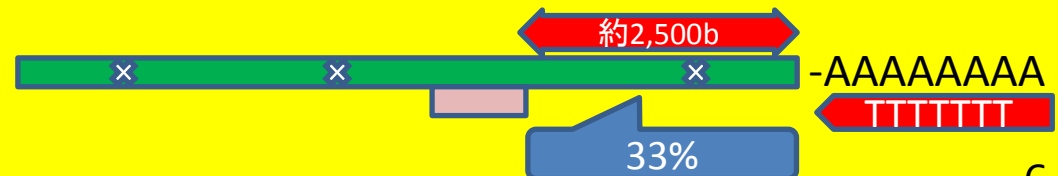
RNase処理

遺伝子の損傷・切断

紫外線、太陽光



Oligo(d)Tによる逆転写



感染性推定遺伝子検査法の評価・開発

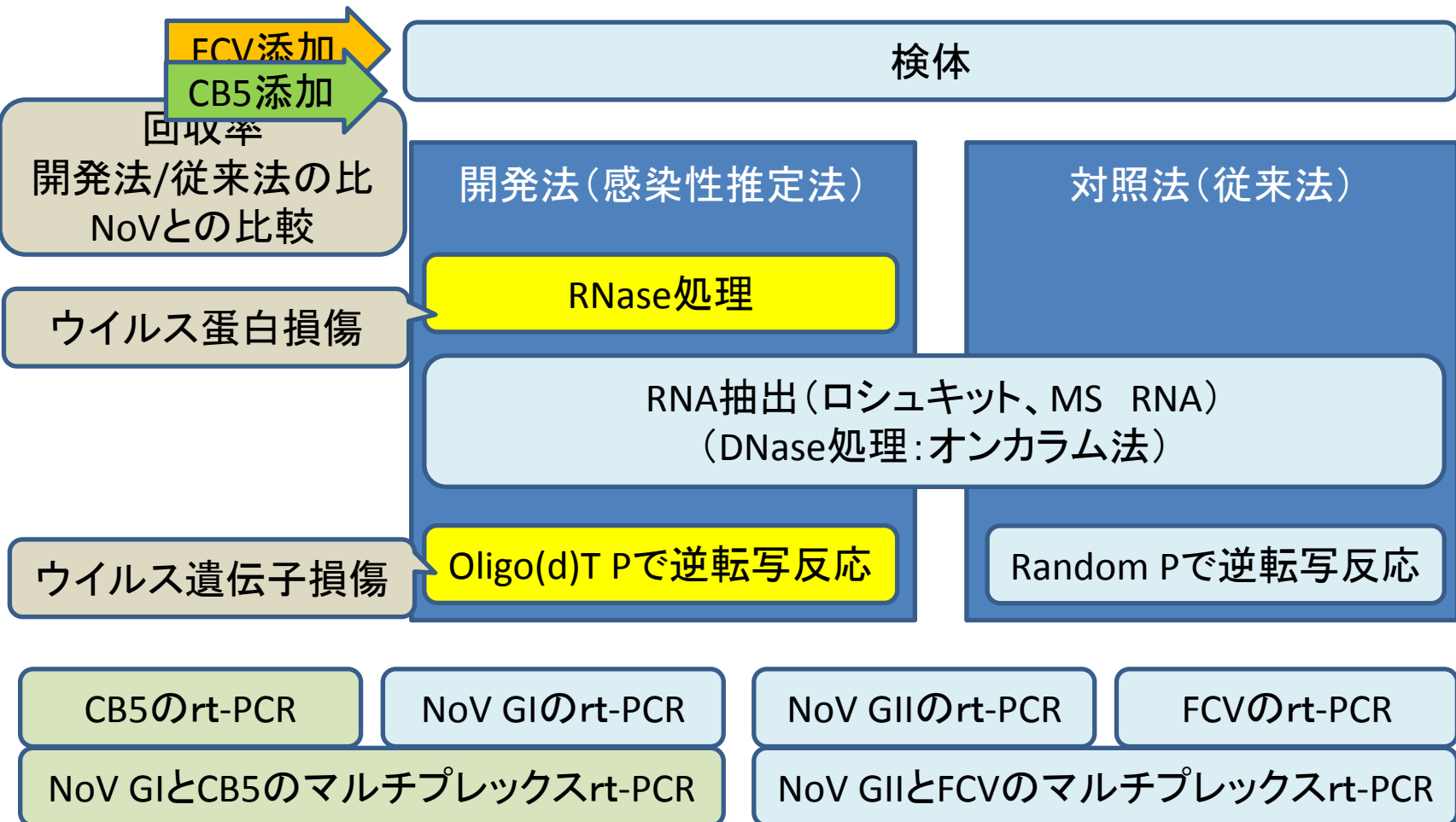
年度	主な研究内容	主な研究成果
H24	報告されている検査法の横断的評価	いずれも、加熱処理では有効だが、紫外線処理、塩素処理では有効でない EMA処理では感度が低下 ⇒RNase処理を基本とする方法を採用
	検査法の開発・改良	OligodTプライマーの導入により紫外線処理、塩素処理でも有効(感度低下) 高感度化(キャリアRNA、RNA抽出キット、逆転写酵素の変更) ネコカリシウイルスのリアルタイムPCR系の確立
H25	検査法の開発・改良	精度向上:内部コントロール(ネコカリシウイルス)の添加条件の決定 低コスト化:マルチプレックス・リアルタイムPCR法(FCV+GII)の確立 高感度化:PCR酵素等の変更 簡便化:従来法(通知法)→対照法 コクサッキーウイルスB5型のリアルタイムPCR系の確立

感染性推定遺伝子検査法の概要

感染性推定遺伝子検査法(H25年度版暫定版)の確立



不活化試験、生存性試験、食品の汚染調査、下水調査に適応



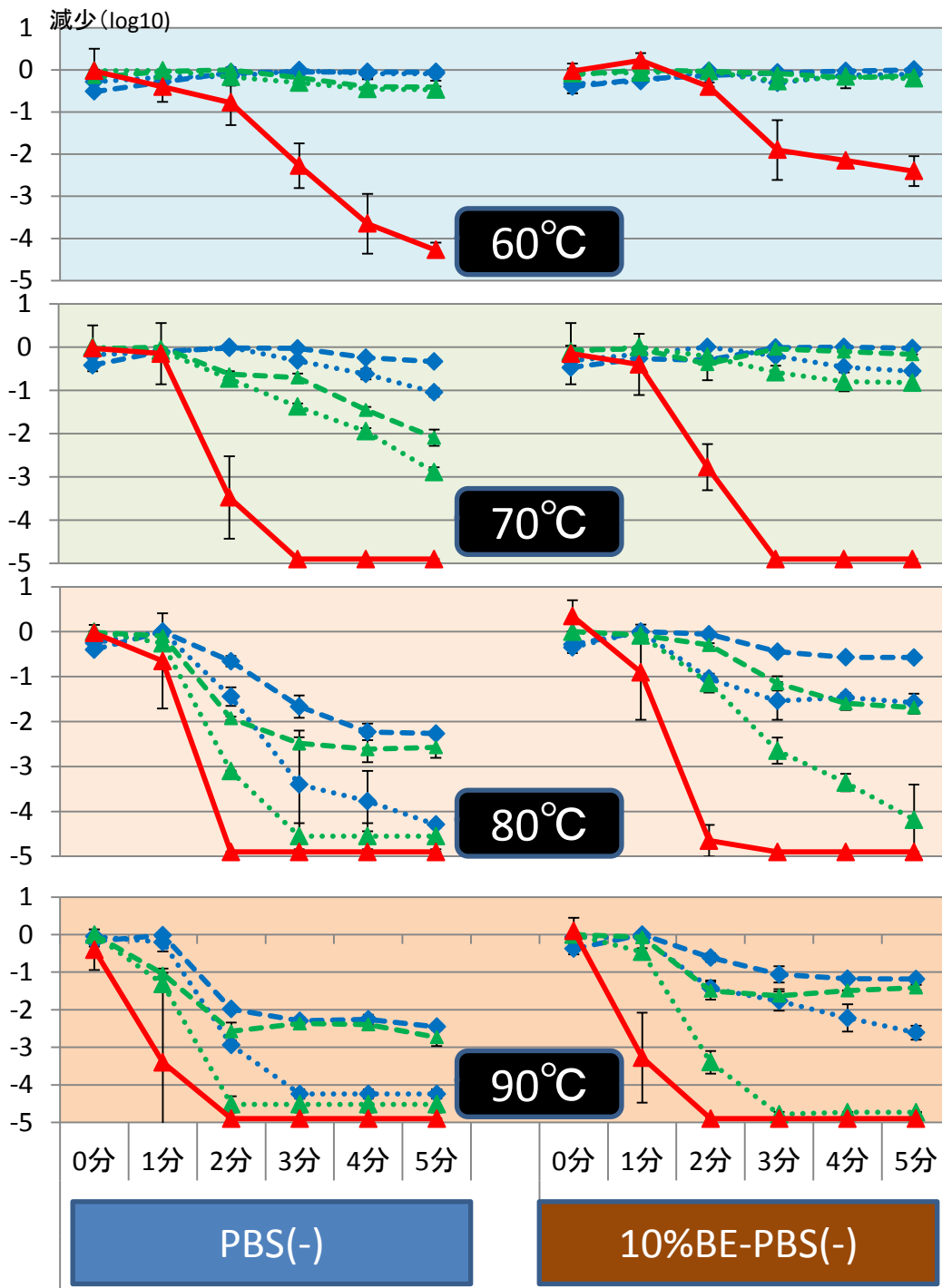
感染性推定遺伝子検査法による ウイルスの生存性試験の概要

目的: 開発法の評価、NoVの生存性の推定

年度	主な研究内容	主な研究成果
H24	加熱(75°C)、紫外線、塩素処理	開発法はより感染価を反映する NoV GIIはFCVより加熱に抵抗性がある傾向
	乾燥状態(清浄・汚染)での生存性 (0-19日) 液体中(清浄・汚染)での生存性 (0-9日)	開発法はより感染価を反映する 清浄環境より汚染環境(10%牛エキス等)で生存性が高い
H25	加熱(60-90°C、1-5分)	開発法はより感染価を反映する NoV GIIはFCVより加熱に抵抗性がある傾向
	乾燥状態(清浄・汚染)での生存性 (6か月)	開発法はより感染価を反映する 清浄環境より汚染環境で生存性が高い 乾燥での生存性はFCVが高い傾向
	海水中での生存性 (夏1回、冬2回、0-11日)	開発法はより感染価を反映する 夏期より冬期の生存性が高い FCVの生存性は低い CB5の生存性もNoVと異なる傾向

加熱による不活化

ウイルス液: NoVGII、FCVをPBS(-)または10%BE-PBS(-)で50倍希釈したもの500μl
 加熱: 60、65、70、75、80、85、90℃
 時間: 0、1、2、3、4、5分



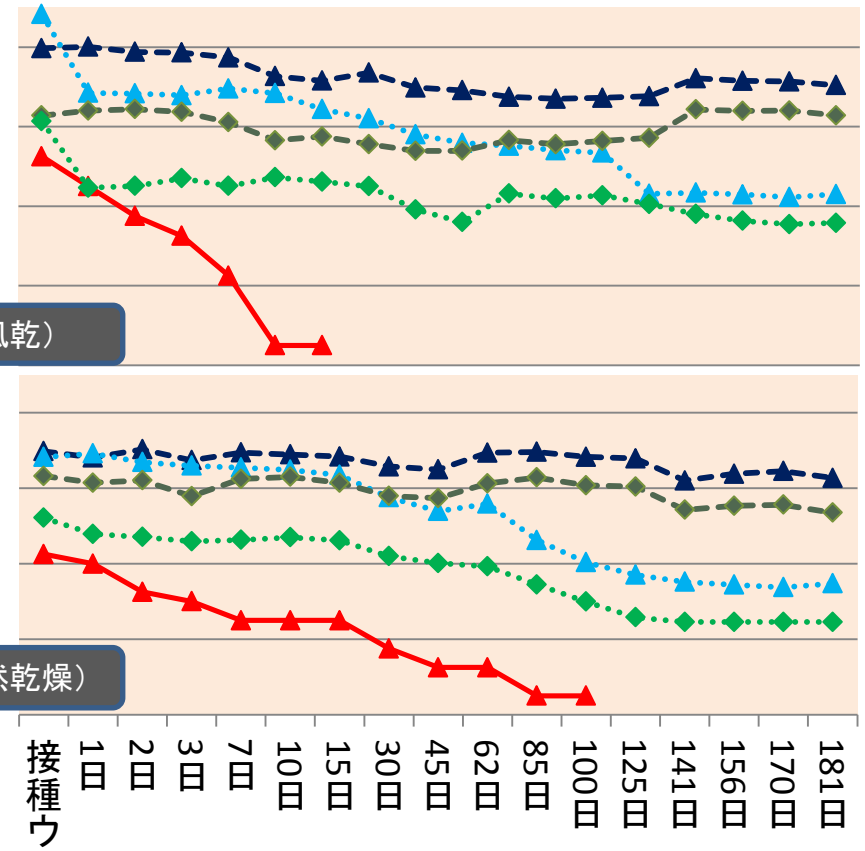
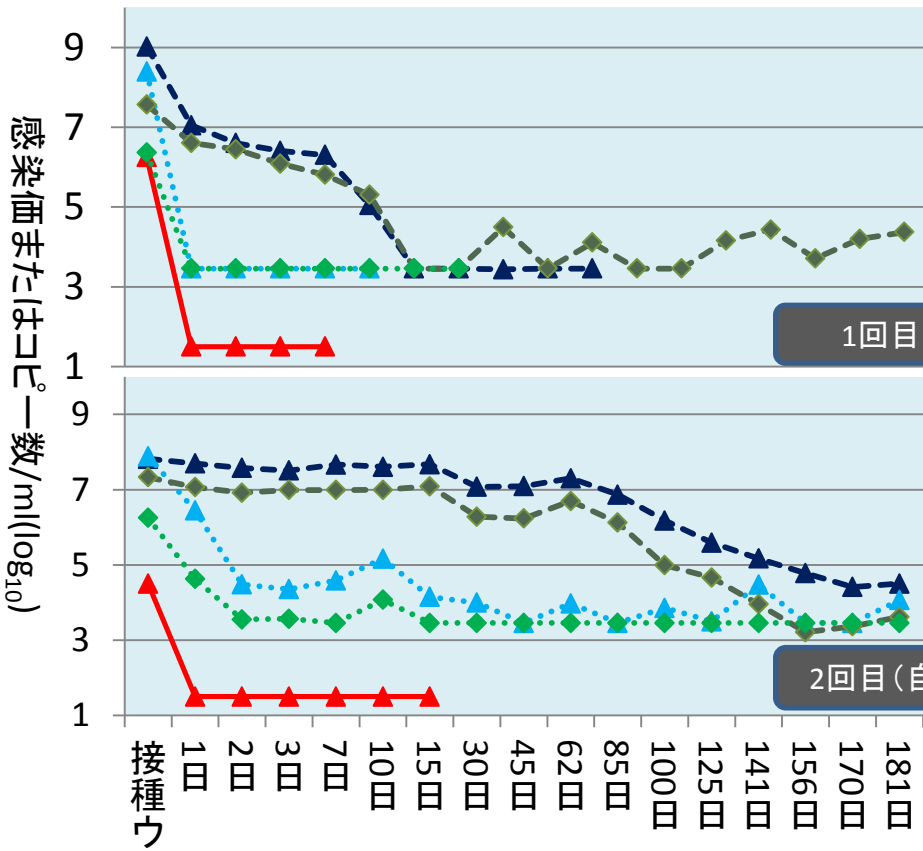
- 開発法は感染価をより反映
 - 10%BE-PBS(-)での抵抗性が高い
 - FCVと比較してNoVは加熱に対して抵抗性が高い可能性がある
- ↓
- 環境により加熱による不活化は異なる
 - 加熱抵抗性においてFCVはNoVの指標には向かない

—◆— GII 対照法 ··◆·· GII 開発法
—▲— FCV 対照法 ··▲·· FCV 開発法
—▲— FCV 感染価

乾燥状態での生存性試験

清浄環境: 0.5%Alb-MEM

汚染環境: 10%BE-MEM



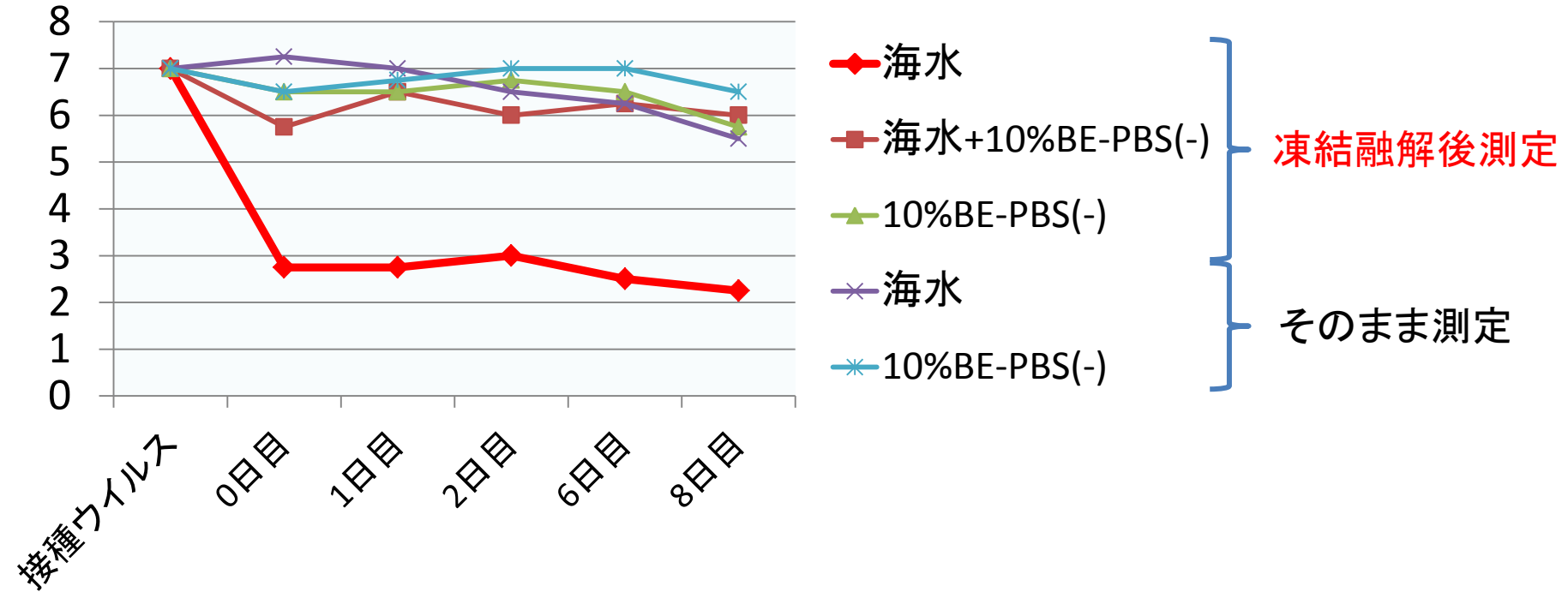
▲ FCV-感染価
▲ FCV-従来法
▲ FCV-開発法
◆ GII 従来法
◆ GII 開発法

GIIとFCVを清浄環境(0.5%Alb-MEM)および汚染環境(10%BE-MEMまたは10%便上清-MEM)で乾燥させた後、室温で生存性試験

- 開発法は感染価をより反映
- FCVとNoV GIIはほぼ同じような傾向
- 汚染環境が清浄環境より生存性が高い(清浄環境では乾燥した時点で感染価は検出限界以下。一方、汚染環境では長い場合、2か月程度感染性あり)
→清掃・洗浄の重要性

人工海水中のFCVの生存性試験

感染価 (log10、1mlあたり)



- FCVは人工海水(おそらく海水も)中で凍結・融解を行うと感染価が低下する(CB5では観察されない)。
↓
- FCVの海水中的での生存試験の結果は、実際の生存性を反映していない可能性がある。
- 海水中的での生存性はFCVとNoV、CB5は大きく異なる(添加回収用ウイルスとして海水検体には不向き。)

感染性推定遺伝子検査法による ウイルスの食品等の汚染実態調査

目的: **開発法の評価、食品等の感染性NoVの検出**

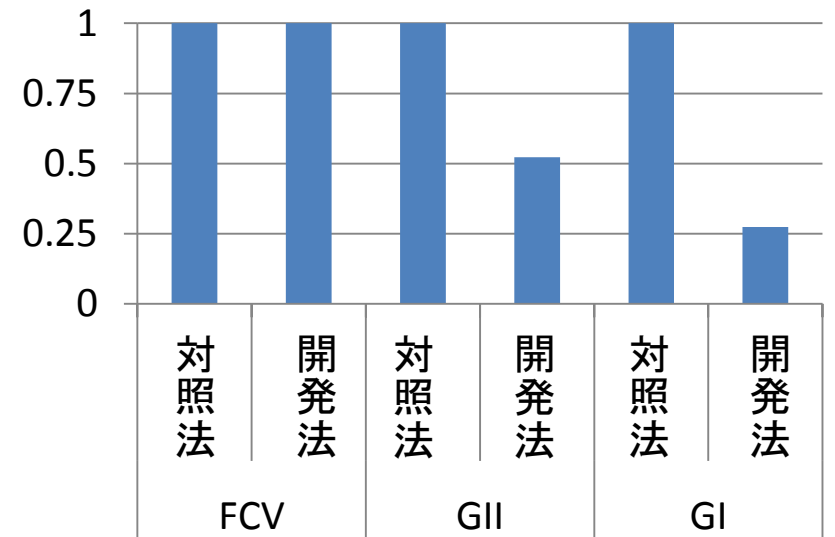
年度	主な研究内容	主な研究成果
H24	市販カキ等のNoV汚染調査への応用	カキには不活化したNoVが含まれている可能性が示唆(便中NoVとの比較)
	下水(流入水・放流水)からのNoV検出への応用	下水放流水には流入水と比較して、不活化されたNoVが多く含まれている可能性が示唆
H25	市販カキ等のNoV汚染調査への応用	カキには不活化したNoVが含まれている可能性が示唆(添加FCVとの比較) カキ乳剤中でFCVは安定 市販カキ(凍結保存品)のNoV汚染率は開発法で測定すると低下
	下水(流入水・放流水)からのNoV検出への応用	下水放流水には流入水と比較して、不活化されたNoVが多く含まれている可能性が示唆 下水放流水中ではFCVは不活化しやすい

	H24	H25
検査法	H24開発法と従来法(通知法): 複雑	H25開発法と対照法: 簡便
不活化粒子の存在の推定	新鮮糞便中のNoVの開発法/従来法の比との比較 下水: 流入水と放流水の開発法/従来法の比	添加FCVのNoVの開発法/従来法の比との比較 下水: 流入水と放流水の開発法/従来法の比

市販カキ(凍結保存)からのNoV検出状況(H25)

項目	ノロウイルスGI (N=131)		ノロウイルスGII (N=131)	
	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 (%)	128 (97.7%)	101 (77.1%)	115 (87.8%)	62 (47.3%)
陽性(実測値0以上) (%)	3 (2.3%)	30 (22.9%)	16 (12.2%)	69 (52.7%)
陽性の内訳	定量値0~10未満	3	15	45
	定量値10以上	0	19	24

FCV補正後の開発法/対照法の比



- 開発法で測定すると、市販カキ(凍結保存品)のNoV検出率および定量値は大きく低下
- カキ中のNoVは不活化されているウイルスが含まれる
↓
- 食品の感染リスクをより正確に把握することができる

下水中のノロウイルス検査結果(H25)

4自治体において、冬期に定期的に下水(流入水・放流水)を採取

コピー数(log10)/mL

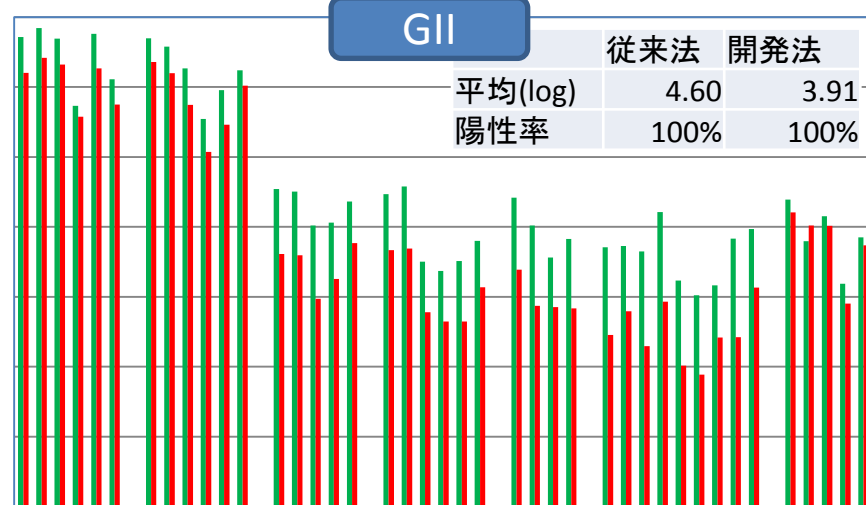
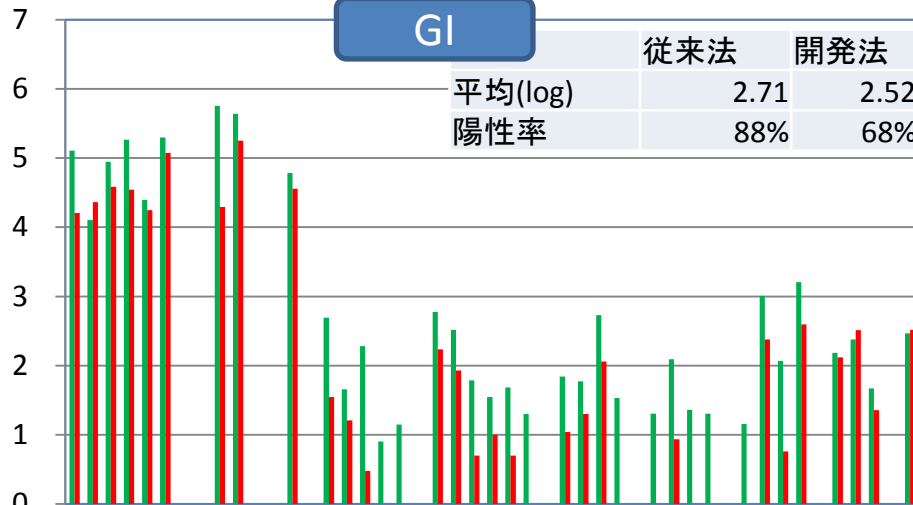
GI

	従来法	開発法
平均(log)	2.71	2.52
陽性率	88%	68%

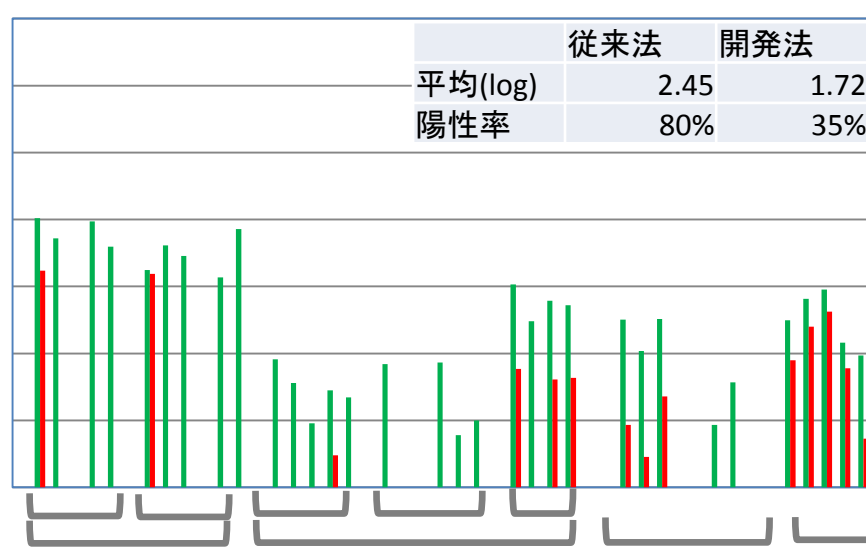
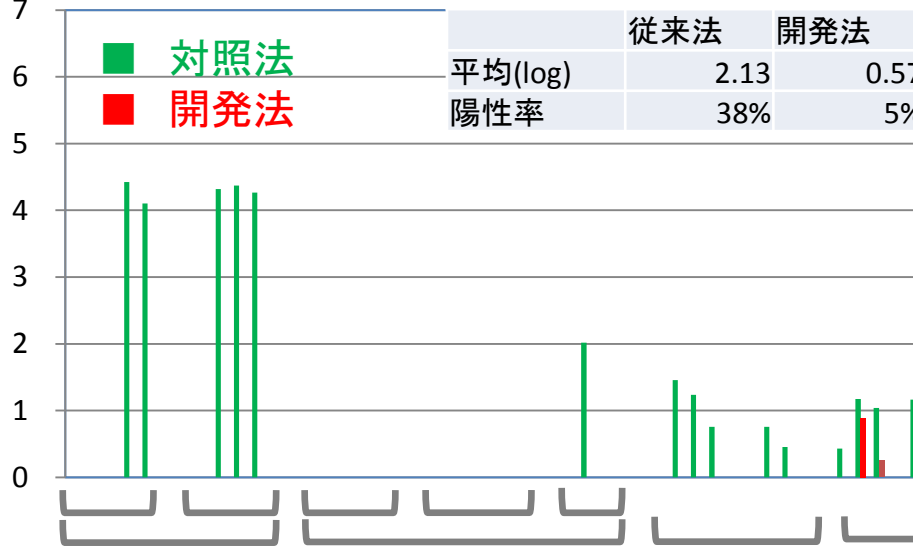
GII

	従来法	開発法
平均(log)	4.60	3.91
陽性率	100%	100%

流入水



放流水



自治体

A

B

C

D

A

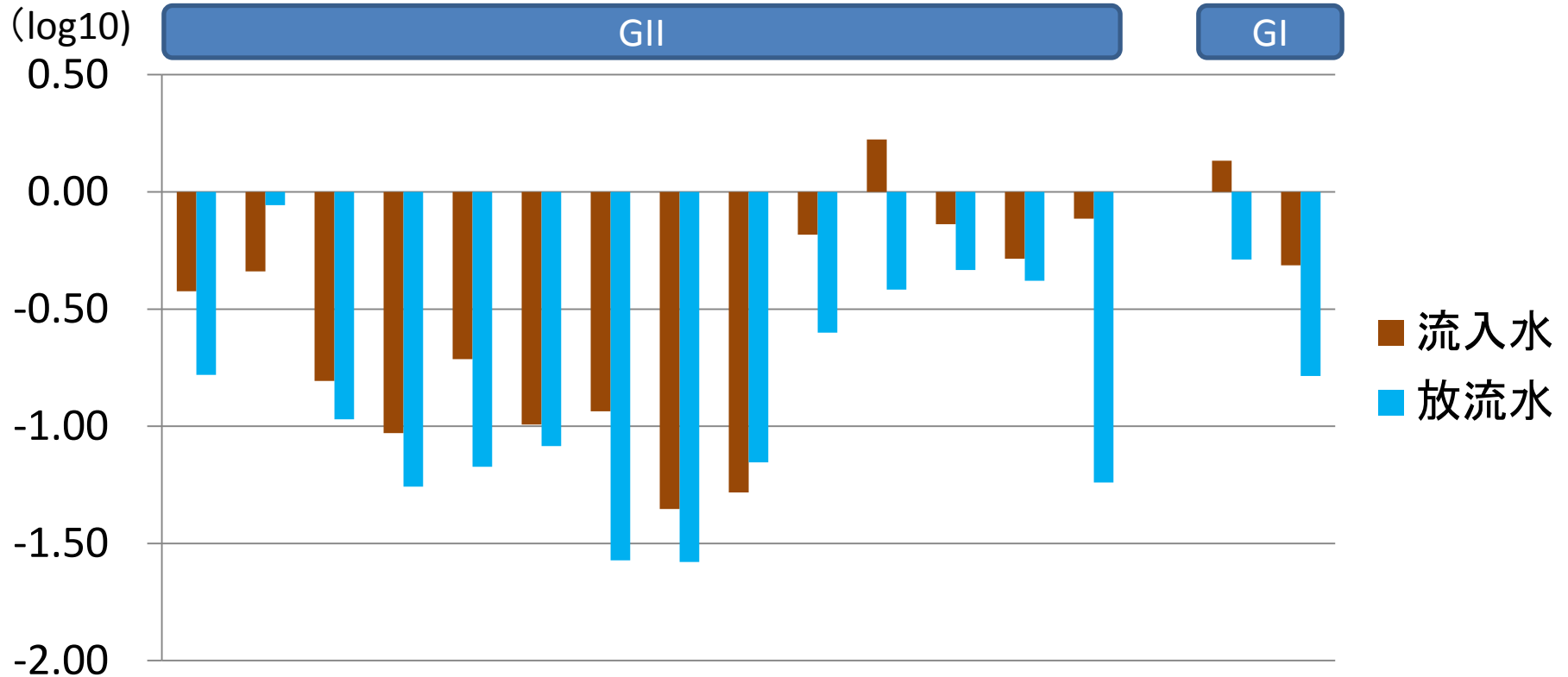
B

C

D

放流水では開発法の検出が低下→不活化ウイルスの存在/検出感度

下水流入水および放流水中のNoV定量値における 対照法に対する開発法の比

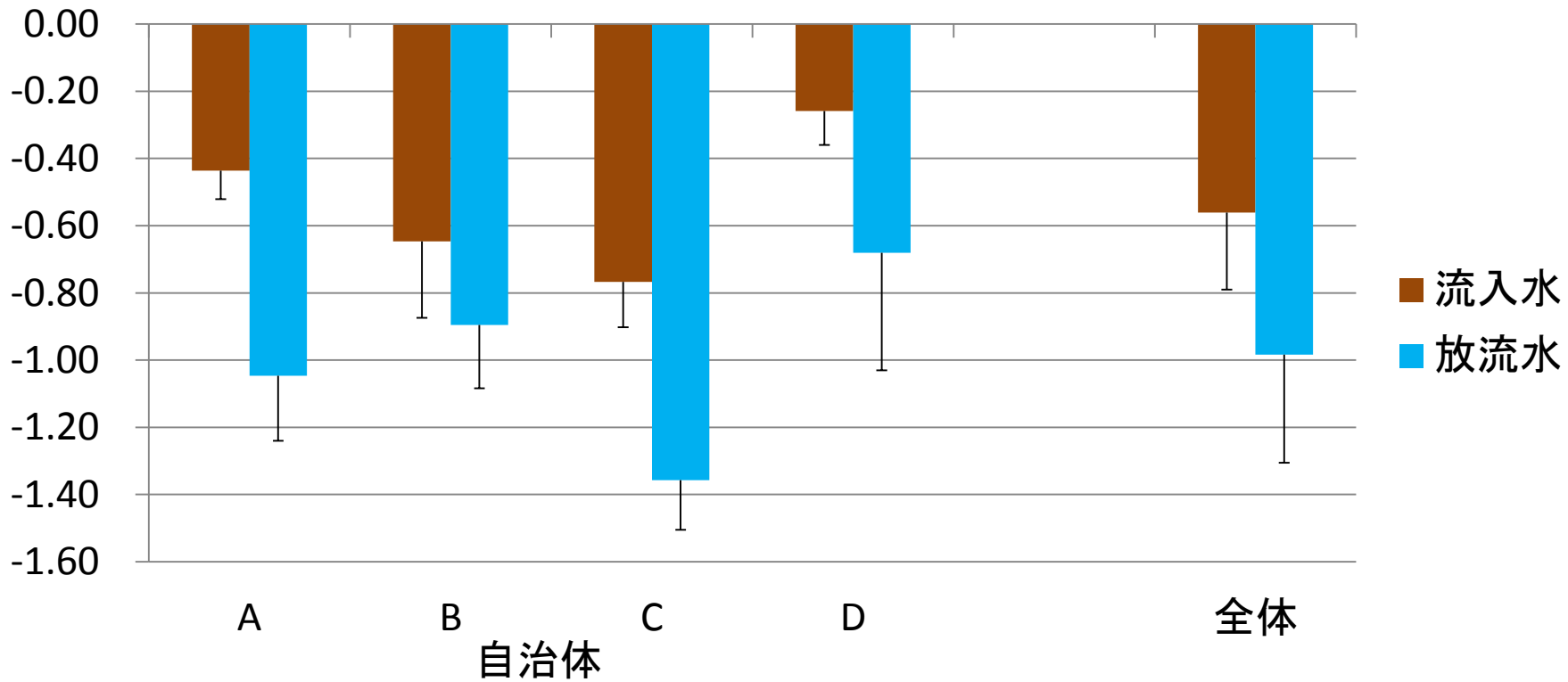


流入水と比較して放流水が開発法の定量値が減少している



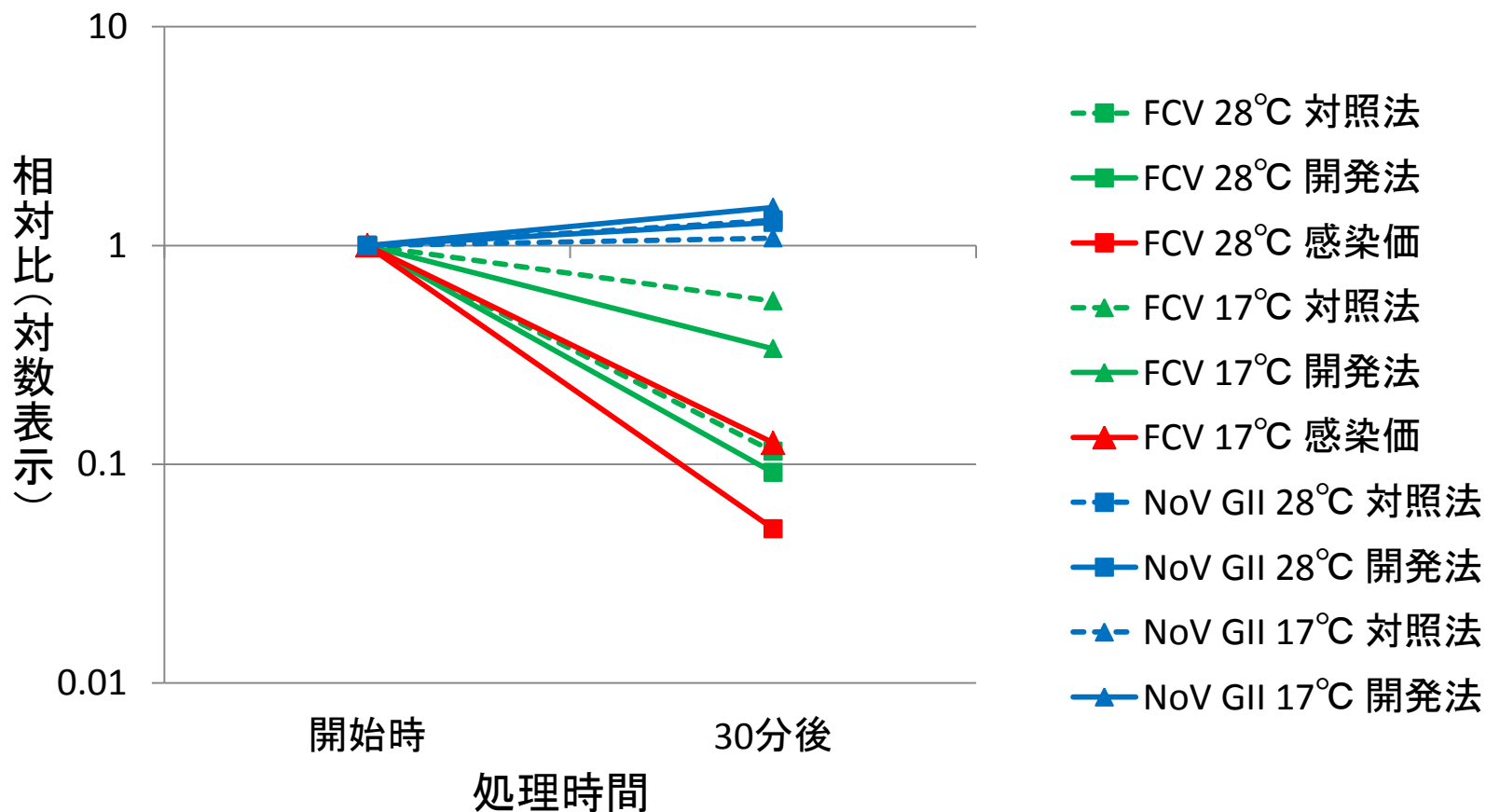
減少分が下水処理における不活化されたウイルス量を反映

下水流入水および放流水中のFCV定量値における従来法に対する開発法の比



流入水と比較して放流水が開発法のFCV定量値が減少している
↓
添加FCVは放流水中では壊れる可能性

下水放流水中(遊離塩素濃度0.4~0.6ppm)での生存性試験



FCVは下水放流水中(塩素をわずか含む)で、不活化されやすい



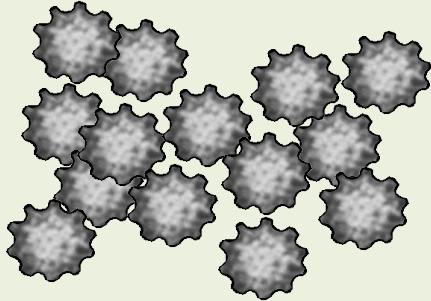
FCVは下水放流水を検体とする場合、内部コントロールとして不適である

抗体被覆粒子/非被覆粒子の鑑別法の開発と応用

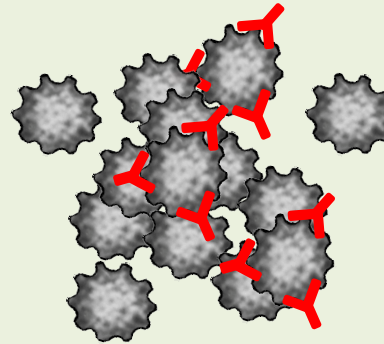
感染



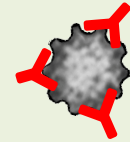
小腸細胞で増殖＝発症
便中にウイルス粒子排出



抗体産生→回復
便中にはウイルス排出



便中のウイルス排出終了



抗体被覆粒子の存在割合や経時的変化
抗体種ごとの関与の有無や程度(分泌型IgAが主体と思われる)
顕性感染者と不顕性感染者での差
長期間排出例では感染性粒子を排出?
調理従事者の職場復帰は感染性の有無で判断すべき








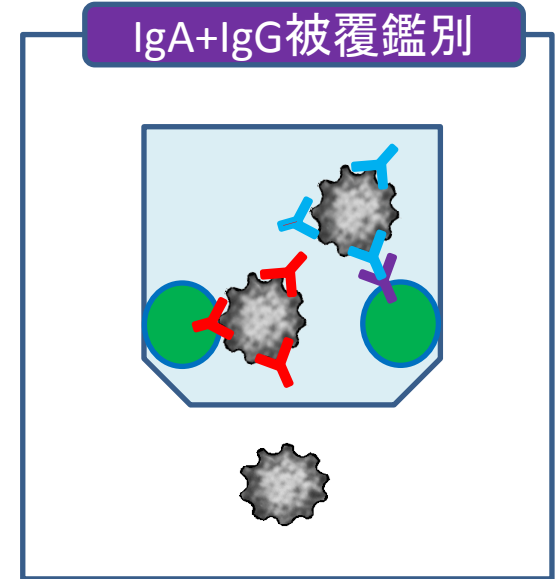
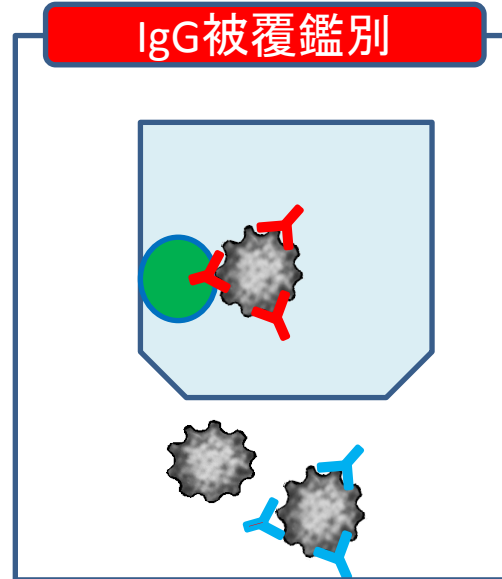
抗体被覆粒子を非感染性粒子と仮定した場合、両者の鑑別法を確立することは、感染者の糞便あるいは食品や環境に存在するNoVの感染性の把握やリスク評価に寄与すると考えられる。

抗体被覆粒子/非被覆粒子の鑑別法の開発と応用

年度	主な研究内容	主な研究成果
H24	ELISA法の利用	固相されている捕捉抗体量が少なく利用困難
	パンソルビンの利用	検査法の検討→鑑別の可能性あり パンソルビンに結合した分画の定量値(課題)
	IgG結合性カラムの利用	鑑別法を確立し、患者便を用いて予備的検討
H25	パンソルビンの利用	検査法の検討→検査法確立(定量法改善、反応条件設定など) 患者便を用いて検証
	IgG結合性カラムの利用	食中毒患者便、従事者便を用いて、顕性感染者と不顕性感染者との違い、経時的変化などを調査

検査法の原理 (プロテインGカラム処理法)

-  プロテインG
-  抗体NoV IgG抗体
-  抗体NoV IgA抗体
-  抗ヒトIgA ウサギIgG抗体
-  ノロウイルス



便遠心上清を
カラムにとおす

抗ヒトIgA抗体を添加し
た便遠心上清をカラム
にとおす



溶出液: 抗体非被覆分画

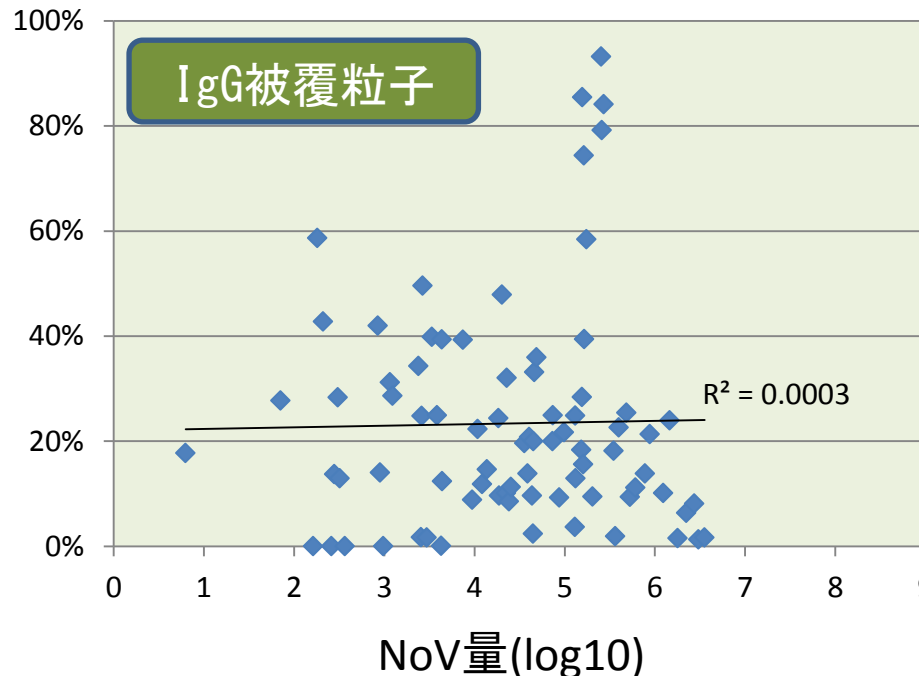
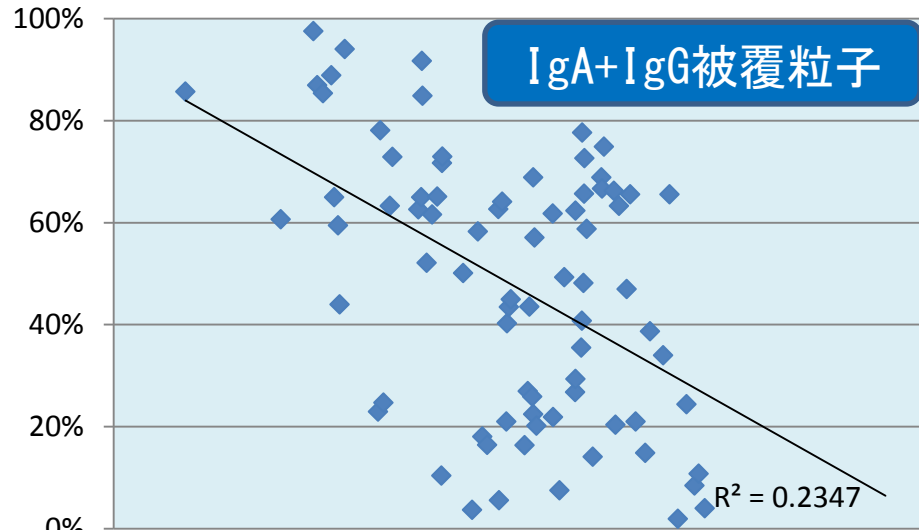
カラム吸着物: 溶出バッファを加え回収→抗体被覆分画

	IgG被覆/非被覆鑑別系	IgA+IgG被覆/非被覆鑑別系
カラムに結合	IgG抗体被覆粒子	IgAまたはIgG抗体被覆粒子
溶出	IgG抗体非被覆粒子	IgAまたはIgG抗体非被覆粒子

糞便中NoV量と抗体被覆粒子の存在割合との相関性

食中毒事件の患者、調理従事者、集団発生の発症者、不顕性感染者から採取した糞便検体についてカラム吸収法で鑑別

抗体被覆粒子の存在割合



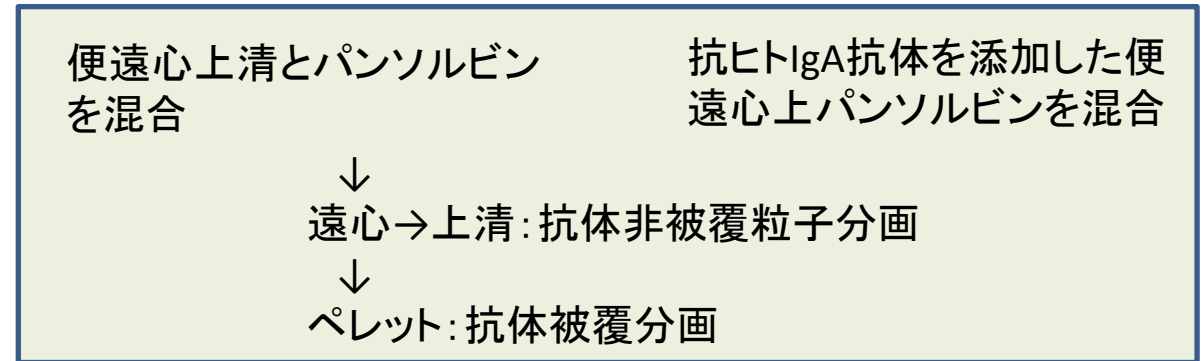
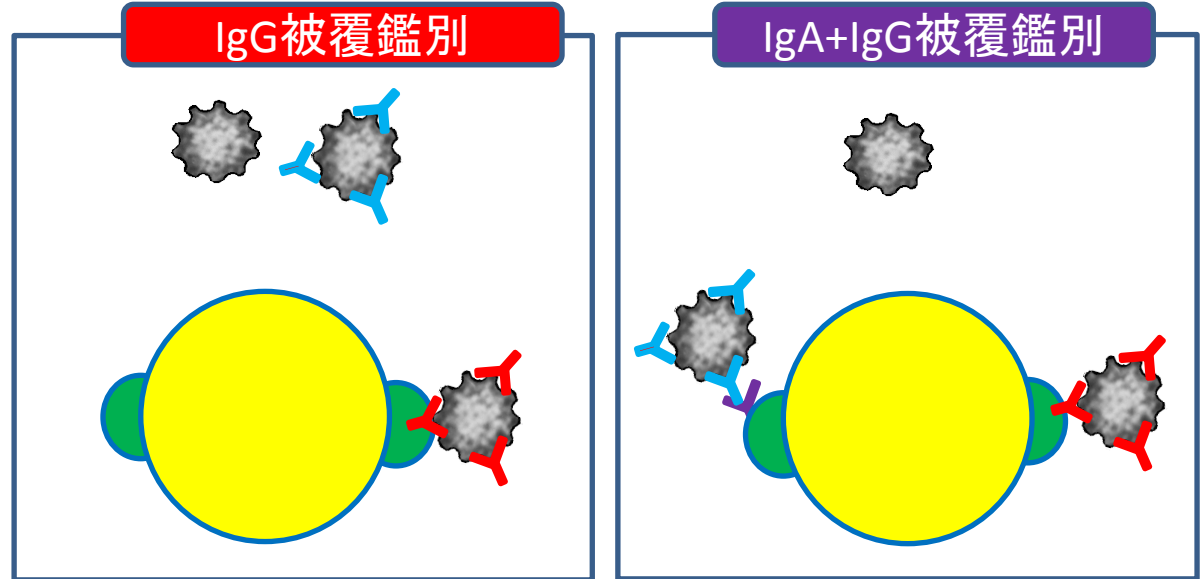
抗体被覆粒子の継時的変化
食中毒患者と調理従事者
発症者と不顕性感染者

↓
明瞭な傾向は観察されなかった

IgA+IgG被覆粒子の存在割合が高い
と、NoV量は少ない
IgG被覆粒子との関連性はない

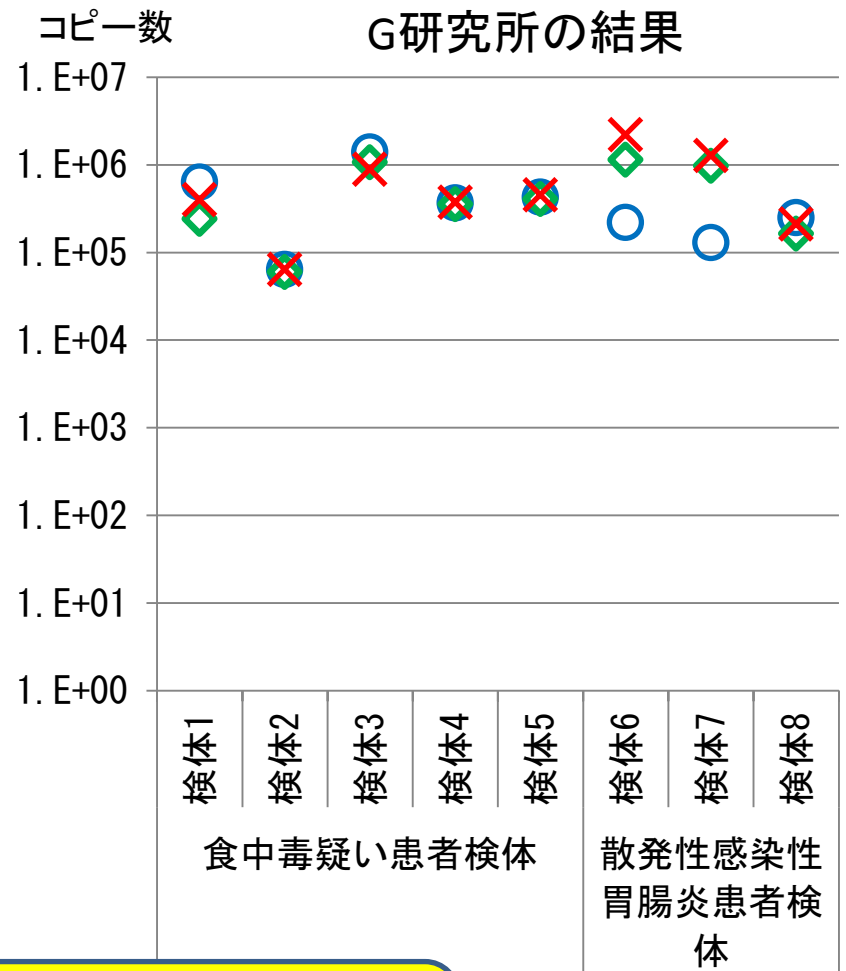
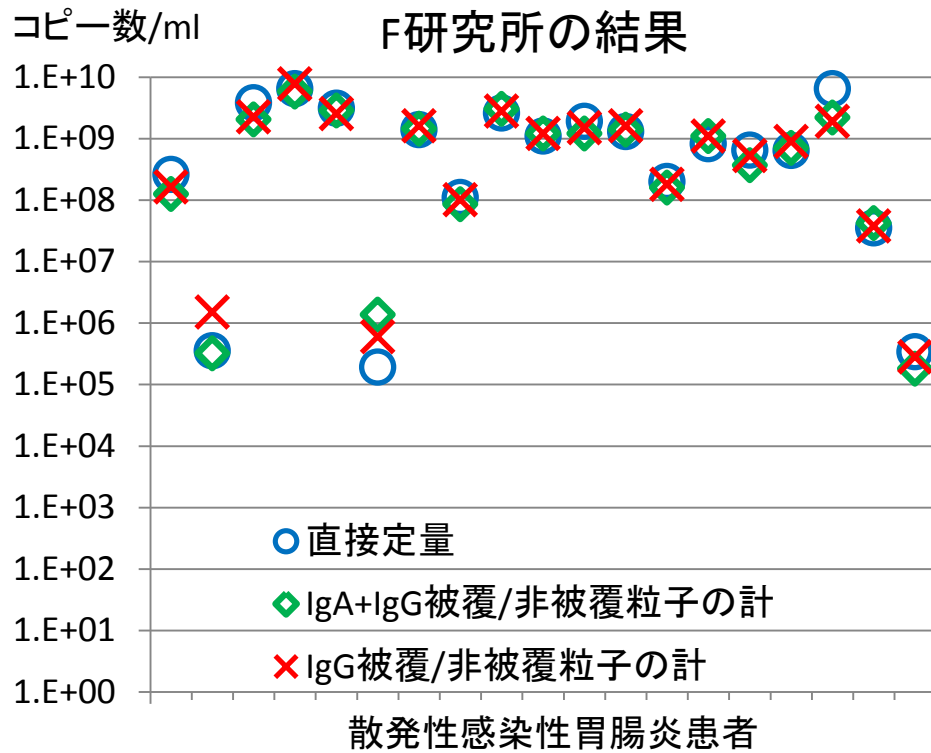
↓
IgA(恐らく分泌型IgA)がウイルスの増
殖/排除に関連している可能性

検査法の原理(パンソルビン吸収法)



	IgG被覆/非被覆鑑別系	IgA+IgG被覆/非被覆鑑別系
パンソルビンに結合	IgG抗体被覆粒子	IgAまたはIgG抗体被覆粒子
上清	IgG抗体非被覆粒子	IgAまたはIgG抗体非被覆粒子

直接定量値と分画後定量値の比較



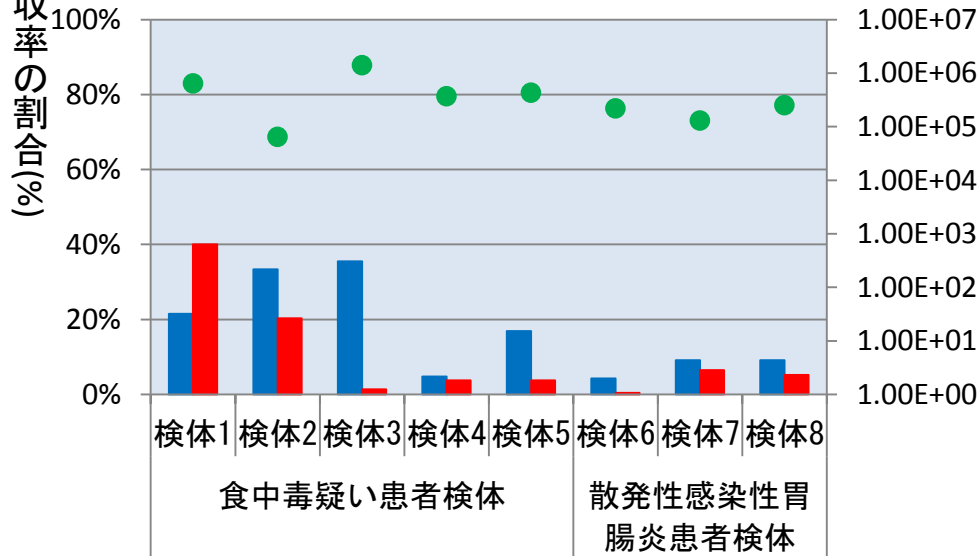
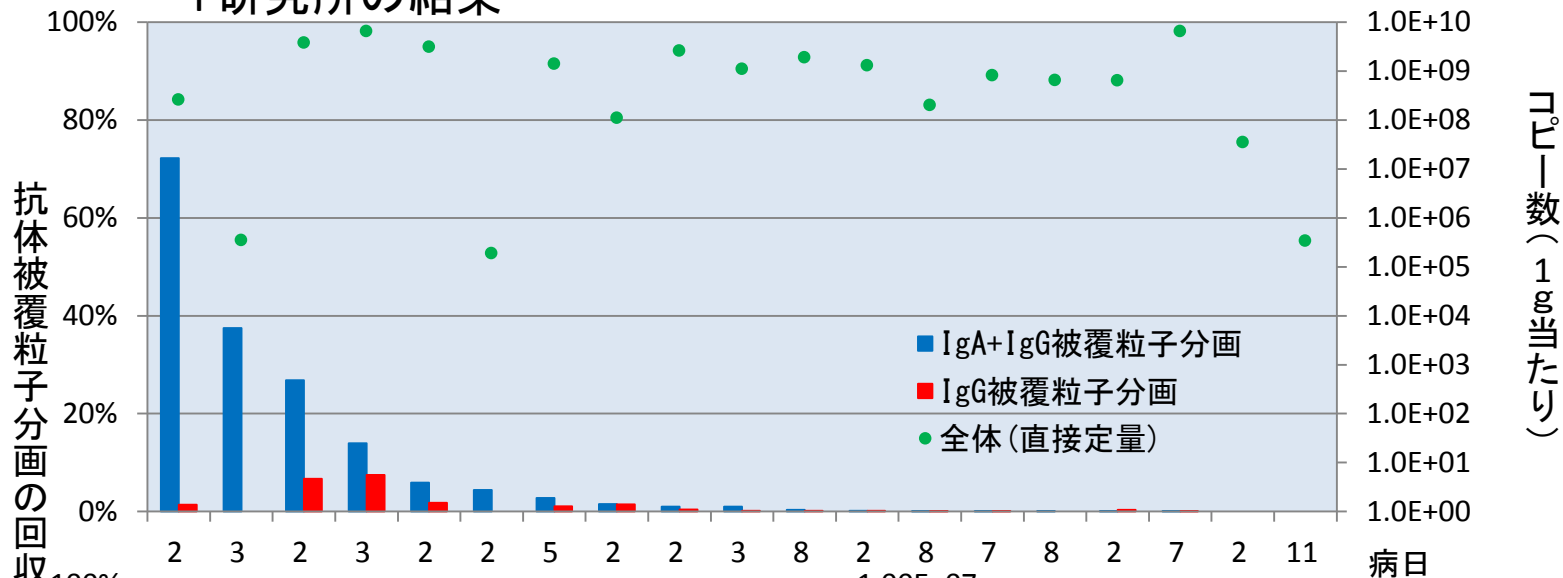
分画後の定量値の総和と糞便から直接定量した値は概ね一致



定量値に問題はない

パンソルビン処理法による抗体被覆粒子/非被覆粒子の鑑別結果

F研究所の結果



G研究所の結果

抗体被覆粒子分画からの回収率

小児患者便22検体中

18検体(82%)は10%以下

4検体(18%)は10~70% (再感染疑い例等)

食中毒疑い患者(大人)5例中

4例(80%)は17~40%

1例は5%

小児と比較し大人は抗体被覆粒子の割合が高い

抗体被覆粒子はIgA抗体被覆粒子が主体

研究の総括と今後の課題

- 開発した感染性推定遺伝子検査法は、加熱、紫外線処理、塩素処理、生存性試験（乾燥状態、液体、海水、下水放流水など）において、従来法より感染価をより反映した。しかし、感染価を完全に反映する訳ではなく、より優れた検査法への改良、感染価との相関性に関するデータ蓄積が必要である。
- FCVはNoVと同様の抵抗性（生存性）を示す場合がある一方、加熱による抵抗性、海水中での凍結融解、下水放流水中での生存性など、異なる点も少なくない。代替えウイルスとしての利用において注意する必要があるとともに、NoVと類似した挙動を示すウイルスの検索が必要である。
- NoVの不活化、生存性を推定するデータが得られた。特に、清浄環境と汚染環境では大きく生存性が異なる可能性が示唆された。
- 感染性推定遺伝子検査法はカキのNoV検査に有用と思われた。今後、より簡便な検査法の開発を目指したい。
- 下水放流水中には流入水と比較して不活化されたNoVが多く含まれていることが示唆された。
- 抗体被覆粒子/非被覆粒子鑑別法を2種類開発した。両法の結果の比較などを行い、結果の信頼性の検証が必要である。また、さらなるデータの蓄積を図る必要がある。
- 感染性推定遺伝子検査法と抗体被覆粒子/非被覆粒子鑑別法の一体化ができなかった。今後検討したい。

謝辞

研究費のご支援をいただきました、内閣府食品安全委員会に感謝申し上げます。

また、研究遂行にあたり、貴重なご助言をいただきました評価委員の先生方にお礼申し上げます。