

# ウイルス性食中毒原因の遺伝子検査標準法確率と

## 全国行政対応整備に関する研究

分担研究：輸入食品のウイルス学的安全性

分担研究者 西尾 治 国立公衆衛生院 衛生微生物学部

ウイルス室長

### 研究要旨

輸入食品、主に東南アジアから輸入されている貝類についてウイルス学的安全性を明らかにする目的から PCR 法で Norwalk-like Viruses (NLVs)、アストロウイルス、A 型肝炎ウイルスの検出を行った。その結果、二枚貝 42 検体中 3 検体（韓国産赤貝、中国産ハマグリおよびアメリカ産カキ）から NLVs が検出された。しかし、アストロウイルス、A 型肝炎ウイルスは陰性であった。貝類はウイルスに汚染されているものが存在したことから輸入食品のウイルス学的な衛生確保のために、規模を拡大し監視する必要がある。輸入食品から検出された NLVs の遺伝子配列を調べたところ、国内の食品由来下痢症患者あるいはカキから検出されたもの同一の遺伝子配列を示したものも見られた。今後輸入食品から検出されたウイルスの動向についての監視が必要である。またこれら食品についての衛生管理の教育が望まれる。

### A. 研究目的

発展途上国、特にアジア地域では依然として衛生環境が悪く、A 型肝炎ウイルス等の危険度の高い病原体の汚染地域が存在している。これらの病原体は患者の糞便から大量に排泄され、それらは河川水・海岸付近の海水を汚染している可能性が高いと推測される。そのような地域で採取された貝類はウイルスに汚染されている危険性が高いと言える。食品による A 型肝炎の集団発生は中国、欧米で起きて

おり、わが国においても過去に見られている<sup>1,2)</sup>。

NLVs による食中毒様の下痢症の集団発生はわが国においても冬期に多発し、同様に欧米を初めとして世界中で起きている。

NLVs および A 型肝炎ウイルスおよび共にその原因食品として二枚貝関連の事が多い。

わが国には輸入魚介類が発展途上国から大量に輸入されている。平成 9 年度厚生科学特別研究（主任 西尾

治)で二枚貝はNLVsおよびA型肝炎ウイルスに汚染されているものが存在する。しかしエビ類は汚染されていないことを既に報告している。

二枚貝のウイルス学的安全性は輸出国および輸入国であるわが国でも殆ど検査されていない。従って、輸入食品のウイルス学的安全性を確保することは国民の健康維持および食品の衛生確保と観点から極めて重要であると言える。

以上のことから、主として東南アジアからの貝類についてウイルス検査を行い、ウイルス汚染の実態を明らかにし、食品の衛生確保に寄与するために調査・研究する事とした。

## B. 研究方法

検査材料：輸入魚介類は愛知県北部市場に1999年8月から2000年3月の間に搬入された貝類で、原則的に毎月5検体を採取した。なお、韓国産カキは現地で買い付けたもので、必ずしも日本に輸入されているものとは同一ではない。

PCR法：二枚貝は中腸腺を、PBSで10から20%乳剤としたのち、10,000rpm・20min遠心し、その上清を30%シュークロースに重層、35,000rpm・180min遠心し、そのpelletをPBSで再浮遊させた。それをRNAの抽出用いた。

ウイルスRNAの抽出：SV Total RNA isolation system (Promega, USA)を用いて行った。

NLVsのcDNAの作製には{Oligo

(dT)(12-18)}、35'のプライマーを用いM-MLV RTで作製した。A型肝炎ウイルス、アストロウイルスに関しては昨年度の報告書に示した(表1)。  
Nested PCR：NV81/82/SM82, Yuri22R/Fの2組を用い、PCR反応は1st PCRと同じ条件で行ったが、サイクル数は35回とした。

PCR産物は電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色しバンドの確認を行った。

PCR陽性のものはダイターミネーター法で遺伝子配列の決定を行った。

NLVsのポリメラーゼ領域(position 4,561~4,861)の301bpをUPGMA法による解析を行った。

## C：研究成績

表3に国別の検査材料とウイルス検査成績を示した。韓国産赤貝、中国産ハマグリおよびアメリカ産カキからNLVsが検出された。しかしアストロウイルス、A型肝炎ウイルスは陰性であった。月別ではアメリカ産カキは9月、中国産ハマグリは1月、韓国産赤貝は2月に採取された。

NLVsの遺伝子解析を行なった系統樹はいずれもG2に属するもので、アメリカ産カキおよび中国産ハマグリは共にMexico類似で、韓国赤貝はYuri類似であった。

## D.研究考察

わが国には、膨大な量の食品が輸入されている。これらのウイルス学的安全性は殆ど調べられていない。今回、

主に東南アジアからの貝類のウイルス学的安全性を検討することとした。

食品によるウイルス感染症としては、二枚貝関連の NLV s による食中毒様下痢症が世界的に最も多い。その原因食品として生牡蠣によることが多い。わが国でも毎年冬期に牡蠣関連集団発生事例が多発し、健康被害が起きている。

今回の調査・研究において、アメリカ産カキ、中国産ハマグリおよび韓国産赤貝から NLV s が検出された。これらの貝の生息している海域が汚染していたと推測される。遺伝子配列から3件ともに G2 に属するものであった。さらに今年度各地での食品関連事例から検出された NLV s と比較すると、中国産ハマグリ、およびアメリカ産カキから得られた NLV s は MX に類似で長野県での事例のカキ（岩手県産および岡山産のカキから検出された NLV s、新潟県の酢ガキによる食中毒様下痢症患者からのもの）とほぼ同一の遺伝子配列であった。なお、MX 類似の NLV s は平成9年および10年に韓国および中国産の二枚貝から検出されている〔平成9年（主任西尾 治）および10年度（主任川本尋義）厚生科学特別研究報告〕。また韓国産赤貝は Yuri 類似のウイルスで岡山県産カキ事例の患者から得られたウイルスとほぼ同様の配列であった。この Yuri 類似のものは輸入食品から過去に検出されていなく、今年わが国で突然多く検出されるようになってきている。今後これらウイルスの国内動向を調べる

必要性がある。

ハマグリは一般的には加熱して食するので、感染する危険性は少ないと推察されるも十分に加熱しなければならない。

赤貝は生食するものの、ウイルスが多く付着している中腸腺部分は食用としないので、良く洗浄することが感染予防対策として重要である。また廃棄する中腸腺の取り扱いにも注意すべきである。この点に関しての衛生教育が必要とされる。

今年度は A 型肝炎ウイルスおよびアストロウイルスが検出されなかった。しかし A 型肝炎ウイルスは平成9年度の研究において検出されており、二枚貝にとる A 型肝炎ウイルスの流行は中国、台湾で過去に大流行が発生しており、日本においても見られている。A 型肝炎は NLV s に比べその病気は重く、時には死亡することもあり、衛生学的な重要性は高いので、今後も継続して調査・研究しなければならないと考えている。

#### E. 研究まとめ

輸入食品のウイルス安全性を確保することを目的として、主に東南アジアからの貝類におけるウイルス学的安全性について調査・研究を行った。その結果、中国のハマグリ、韓国の赤貝およびアメリカのカキから NLV s が検出された。食品の衛生確保の観点からウイルス学的安全性の監視を強める必要性がある。

## F. 文献

1) Konno Tet al. , Oyster associated hepatitis A, Hokkaido Igaku zasshi, 58, 553-555, 1983.

2) Holzer et al. , Incidence of hepatitis virus infections and diseases in travelers returning from the tropics. Schweiz. Med. Wochenschr, 110, 1514-21, 1980.

## G. 研究発表

### 学会発表

1. 川本尋義、沢田晴美、西尾 治他、ウイルス性食中毒遺伝子検出検査指針確立と行政対応に関する研究、第40回日本臨床ウイルス学会、大阪、1999.5.13-14

2. 鈴木 博、加藤由美子、南部みほ、西尾 治、二枚貝におけるウイルス汚染指標、第58回日本公衆衛生学会総会、大分、1999.10.221-22、頁720

3. 原みゆき、古屋由美子、片山 丘、

吉田芳哉、今井光信、長谷川斐子、西尾 治、食中毒様の集団下痢症から検出されたA群ロタウイルスについて、第47回日本ウイルス学会総会、横浜、1999.11.7-9 P179

4. 西川 真、渡邊香奈子、新井礼子、篠川 旦、加藤由美子、西尾 治、鈴木 宏、短期間に発生した6集団の急性ウイルス性胃腸炎事例におけるノーウオーク様ウイルスの分子疫学的研究、第47回日本ウイルス学会総会、横浜、1999.11.7-9 P176

5. 加藤由美子、南部みほ、西尾 治、西村浩一、全国各地で検出されたヒトカリシウイルスの遺伝子配列、第47回日本ウイルス学会総会、横浜、1999.11.7-9 P197

西尾 治、加藤由美子、鈴木 博、牛島廣治、秋山美穂、輸入食品のウイルス学的安全性について、第47回日本ウイルス学会総会、横浜、1999.11.7-9 P199

表1. 使用プライマー  
小型球形ウイルス

---

35'	: 5'-CTT gTT ggT TTg Agg CCA TA-3'	(位置4,944)
36	: 5'-ATA AAA gTT ggC ATg AAC A-3'	(4,475)
NV81	: 5'-ACA ATC TCA TCA TCA CCA TA-3'	(4,872)
NV82	: 5'-TCA TTT TgA TgC AgA TTA-37	(4,543)
SM82	: 5'-CCA CTA TgA TgC AgA TTA-3'	(4543)
Yuri22F	: 5'-ATg AAT gAg gAT ggA CCC AT-3'	( )
Yuri22R	: 5'-CAT CAT CCC CgT AgA AAg Ag-3'	( )
SR33	: 5'-TgT CAC gAT CTC ATC ATC ACC-3'	(4,876)
SR48	: 5'-gTG AAC AgC ATA AAT CAC Tgg-3'	(4,754)
SR50	: 5'-gTg AAC AgT ATA AAC CAC Tgg-3'	(4,754)
SR52	: 5'-gTg AAC AgT aAT AAA CCA T-3'	(4,754)
SR46	: 5'-Tgg aat TCC ATC gCC CAC Tgg-3'	(4,754)
アストロウイルス		
AstFor	: 5'-ACT ggA TCC AAA gAA gTg TgA Tgg CTA gCA-3'	(4,282)
Ast End2	: 5'-gTC ggA TTC CTA CTC ggC gTg CCg C-3'	(6,715)
AV 244Mon	: 5'-ggT gTC ACA ggA CCA AAA CC-3'	( )
AV82b	: 5'-gTg AgC CAC CAg CCA TCC CT-3'	( )
A型肝炎ウイルス		
P17	: 5'-CCA AgA AAC CTT CAT TAT TTC ATg-3'	(3,333)
N17	: 5'-CCA gCA gCT AAA gAA AAC CCA Aa-3'	(2,799)
P15	: 5'-gCA AAT TAC AAT CAT TTC TgA TgA-3'	(3,273)
N16	: 5'-CCA AgA AAC CTT CAT TAT TTC ATg-3'	(2,907)
ポリオウイルス		
#24	: 5'-gAA TTC CAT gTC AAA TCT AgA-3	(2,872)
#21	: 5'-TTT gTg TCA gCg TgT AAT gA-3'	(2,399)

---

表1. 国別の検査材料とウイルス検査成績

国名	検査材料	例数	陽性数	検査成績		
				NLV s	Astoro	A型肝炎
韓国	カキ*	5	0	0	0	0
	赤貝	7	1	1	0	0
	ハマグリ	4	0	0	0	0
	アサリ	1	0	0	0	0
	平貝	1	0	1	0	0
	ルーム貝	1	0	0	0	0
	サザエ	6	0	0	0	0
	姫サザエ	3	0	0	0	0
	トコブシ	4	0	0	0	0
北朝鮮	タイラギ	5	0	0	0	0
中国	ハマグリ	3	1	1	0	0
	アワビ	1	0	0	0	0
アメリカ	カキ	1	1	1	0	0
計		42	3	3	0	0

\* : 現地買い付け品

表2. 1999年8月から2000年3月の月別NLV s 検出状況

国名	8	9	10	11	12	1	2	3	計
韓国	0/4	0/4	0/4	0/8	0/3	0/3	1/4	0/2	32
北朝鮮	0	0/1	0/2	0	0/1	0/1	0	0	5
中国	0	0	0	0	0/2	1/1	0/1	0	4
アメリカ	0	1/1	0	0	0	0	0	0	1
計	0/4	1/6	0/6	0/8	0/6	1/5	1/5	0/2	42

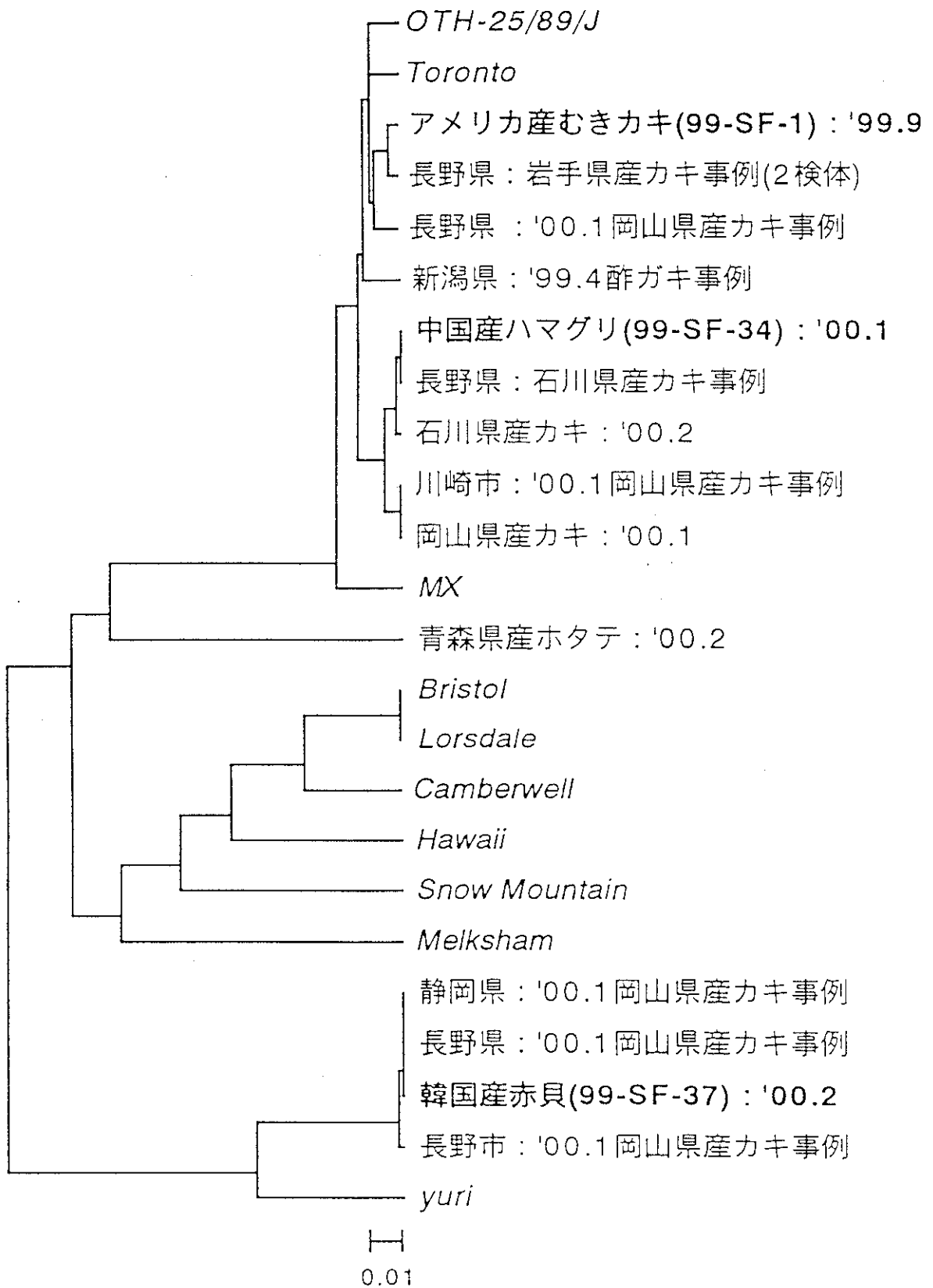


図1.1999年~2000年の輸入食品と国内から検出されたNLVsの系統樹

## 研究班資料



## 研究班史

千年紀の平成12年春、平成11年度をもって厚生省厚生科学特別研究事業は最終を迎えた。私は研究班の代表として、この千年紀をもってこれまで続けてきた研究班の仕事に一区切りをつける意味で班会議にて業務完了解散の宣言を行った。

この10年間の研究のけじめの意味で、私は私たちの研究史と班経緯を忘れない思いも込めてここに記すこととした。

私たちの「厚生科学全国ウイルス性食中毒研究班」は、平成2年に地方衛生研究所ウイルス胃腸炎下痢症研究者が中心核となり連帯連携研究をめざし設立した研究班を今日まで発展し継続してきたいわば野武士戦友会ともいえる。平成9年度に私たちの研究成果提案が基となり食品衛生法に初めてウイルス性食中毒が登場すると同年度に、厚生省として「特段の緊急行政対応研究」の必要な場合に認められる厚生科学「特別」研究事業に私たちの研究が認可を受けるまでの7年間は、まさに今日的NGOといえる私的研究プロジェクトとして活動してきた。

私はこの研究組織とその研究戦略構想の発案段階からまとめ役を引き受けてきたが、想い起こせば多くの戦友と巡り会った。日本ウイルス学会、日本臨床ウイルス学会、全国地方衛生研究所協議会衛生微生物学技術協議会などに広域研究連携の意義や展望を、そして研究戦略を提案しながら多くの同志たちと誠意を持って約束を果たしてきたと確信している。その間、健康福祉・厚生事業団（千代田生命、大同生命）など助成団体から研究支援を得て、研究班は全国都道府県を網羅する広域連携研究班へと発展できたことに大変感謝している。平成5年には、それまで原因不明とされてきた非細菌性食中毒の全国実態を明らかとするという目標をたて、班名も「食品媒介ウイルス性胃腸炎集団発生実態調査研究班」と改め、平成元年から5年間に限って国内の非細菌性原因物質不明食中毒事件、有症苦情事例、施設内集団発生事件を対象に時系列計量実態調査を行い解析検討を加え平成7年12月に「食品媒介ウイルス性食中毒全国実態調査研究班報告」をまとめ限定発行（千部）した。

私たちの研究に新聞各社（朝日・毎日・共同通信等）やTV局など報道機関の取材が相次ぎ、私も研究班の責任者としてお応えすることになってしまった。研究情報の公開により、「ウイルス性食中毒」現象も次第に国民に理解して頂くことになり報道の効果も思い知ることもとなった。それまで、食品衛生法にも認められなかったウイルス性食中毒とその病原体も法的に認ざるを得ない大きな転換点をわが研究班がつくったことを私たちは誇りに思っているし、「ウイルス性食中毒」疫学の研究史として留めたい。これは、非常に長く続いた下痢症ウイルス研究の黎明期で、手探り手弁当の自由で楽しく燃えた時期でもあった。平成9年5月30日付で食品衛生法が改正され、小型球形ウイルス（SRSV）を代表にウイルスが同法史上に初めて登場し、「ウイルス性食中毒」と呼ぶことも法的に正規に認知されるに至り日本の食品衛生行政史に大きな転換点を与えることとなった。

私たちは、それまでウイルスを食品衛生法に認知して頂きウイルス研究の食品衛生法における意味を理解して頂くことを当初の目標としてきたが、法改正目途のついた後、私たちはウイルス診断検査学や病因遺伝子解析など、本来あるべき姿「ウイルスの狩人」（Virus Hunters：ウイルスハンター）としての仕事へ研究をシフトしたいと考え、平成8年に班名を「ウイルス性胃腸炎研究班」へと戻した。細胞培養によるウイルス分離検出は現在もなお不可能であるSRSVも、当時の検査法では電子顕微鏡（EM）の形態学的観察に依存していたし、私たちが手探りで開発してきたウェスタンブロット（WB）法など免疫化学的診断法も大変煩雑で熟練を要する特殊な検出法であったことから、遺伝子検査法に焦点をあてた検査指針（技術ガイドライン）を策定し厚生省食品衛生局（食品保健課と乳肉衛生課）に提案した。

この作業の山場には、東京都庁施設（新宿健康プラザ）をお借りして厚生省食品衛生局2課員とわが班員が集まり合同検討を行った。この会議を私たち研究班では「新宿プラザ会議合意」と呼んでいる。このときの当班提案が、食品衛生法改正に先立ち平成9年1月厚生省生活衛生局から本邦初の食品媒介ウイルス性食中毒対策検査指針として全国に通知され用いられることになった。平成9年度から私たちは厚生科学特別研究事業「厚生科学全国ウイルス性食中毒研究班」体制に改組し厚生省科研受託団体として広域連携研究プロジェクト体制を確立した。

私たち研究班の10年間は、「ウイルス性食中毒」と「ウイルス性胃腸炎下痢症」を研究する全国70箇所の地方衛生研究所、国立感染症研究所、国立公衆衛生院、国公立大学の研究者70余名からなる分担・協力研究者の地道な精進努力と情熱で支えられてきた。この全国研究者連携の研究システムは研究先進国の米国ですら例が無いし、私たちのような研究展開組織も類がないと誇りに思っている。

私たちには国内「ウイルス性食中毒」と「ウイルス性胃腸炎」の疫学データが貴重な検体に裏打ちされSRSV遺伝子配列データと共に蓄積されてきた。これら研究資産は、今後もデータ解析を通じ公開の努力を続ける予定である。

さて、私たちは厚生科学特別研究事業最終年度に全国初の列島縦断環境水系SRSV生態調査と輸入食品のウイルス汚染調査を行った。私たちの研究班がウイルス検出系としてグローバルスタンダードをめざし設計した汎用プライマーを実戦応用し高感度GLP化RT-PCRでウイルス遺伝子検出を行った。ここには、SRSVの水環境でのウイルス生態と従来水質汚染指標との相関、ヒトへの影響リスク評価に繋がる疫学パラメータとしての可能性など、まだ困難で理解と解決すべき諸課題が含まれている。分離培養やウイルス定量のできないSRSVは、ヒトからヒトへと感染伝播する一方で、ヒトから環境陸水系により「かき」などにウイルス蓄積というかたちで再び陸のヒト社会に戻る点と線がようやくつながった。

水系ウイルス汚染の宿命的被害者「かき」が、成熟まで1個1個が日平均何トンもの海水浄化をしてくれていたことを忘れない。海のない岐阜県に住む私にとって、「かき」とSRSV研究で大変多くのことを教えられた。

私たちの研究はこれで終わった訳でなく、次に発展すべき研究対象の姿が明らかになってきた。私たちの新しい研究グループは、新世紀に向けて「健康・環境」をテーマに、より確実な一步を今踏み出そうとしている。今後、より多分野の専門研究者たちとの連携協力研究のもとに環境汚染負荷低減と制御・除去に向け環境リメディエーション・テクノ開発へ研究をシフトする。

岐阜県には研究開発立県構想施策のもと、平成10年度に私の所属する県生物産業技術研究所（岐阜生物研）を新たな研究特化専門機関として岐阜県美濃加茂市蜂屋町に新設して頂いた。この蜂屋の地は「はちや柿」の発祥地であり、海の「かき」とも語呂合わせで些か因縁を感じている。これまで、私は研究班を「かき」を守る会とも称した。広島県や宮城県など美味特産「かき」と食文化を守るためにも、また「安全・安心」の水資源の供給保全に責任ある岐阜県としても、環境水保全研究プロジェクト「アクアピュア2010」を是非発展させたいと願っている。

川 本 尋 義  
岐阜県生物産業技術研究所

## 研究班組織

本研究班は、分担研究者（平成9～10年度19名、平成11年度14名）と各協力研究者ら（平成9～10年度38名、平成11年度23名）により下記表の全国都道府県（平成9～10年度は17都道府県、平成11年度は11都道府県）研究機関、国立研究機関、大学研究者からなる全国縦断広域連携研究体制によるプロジェクト研究組織を構成し、研究対象と目的に応じた編成で研究実施した。

### 平成9～10年度厚生科学特別研究班組織体制

研究者	分担する研究項目	所属（研究実施場所）	所属 職名
川本尋義 林菜穂子 神山恵理奈 猿渡正子	研究班長・代表総括 研究協力者 研究協力者 研究協力者	岐阜県生物産業技術研究所 同上 同上 岐阜県保健環境研究所	部長研究員 主任技師 技師 主任専門研究員
沢田春美  大山 徹 吉澄志磨 玉手直人	北海道地域担当 ウイルス検出・解析研究 協力研究者 シークエンス解析 協力研究者 協力研究者	北海道立衛生研究所  同上 同上 同上	疫学部主任 研究員 生物工学室長 疫学部 疫学部医療検査専門員
斎藤博之	東北地域担当 ウイルス検出・解析研究	秋田県衛生科学研究所	主任
三上稔之	東北地域担当 ウイルス検出・解析研究 沿岸養殖モニター	青森県環境保健センター	主任研究員
秋山和夫  沖村容子 有田富和	東北地域担当 ウイルス検出・解析研究 沿岸養殖モニター 協力研究者 協力研究者	宮城県保健環境センター  同上 同上	上席主任研究員  研究員 技師
篠川旦  西川 真	関越地域担当 ウイルス検出・解析研究 協力研究者	新潟県保健環境科学研究所  同上	ウイルス科長  専門研究員
関根大正  平田一郎 中村敦子 佐々木由紀子 森 功次 長島真美	東京都担当 ウイルス検出・解析研究 協力研究者 協力研究者 協力研究者 協力研究者 協力研究者	東京都立衛生研究所  同上 同上 同上 同上 同上	ウイルス研究科長  副参事研究員 研究員 研究員 研究員 研究員
野口有三  宗村徹也 宇宿秀三	京浜地域担当 ウイルス検出・解析研究 協力研究者 協力研究者	横浜市衛生研究所  同上 同上	検査研究課担当係長  技術吏員 技術吏員

研究者	分担する研究項目	所属（研究実施場所）	所属 職名
杉枝 正明	静岡中部地域担当 ウイルス検出・解析研究、SRSV 培養	静岡県環境衛生科学研究所	主幹
柴田 伸一郎	名古屋地域担当 ウイルス検出・解析研究	名古屋市衛生研究所	研究員
山下 照夫 鈴木 康元 栄 賢司 小林 慎一	東海愛知県地域担当 ウイルス検出・解析研究 協力研究者 協力研究者 協力研究者	愛知県衛生研究所 同上 同上 同上	主任 ウイルス部長 第一ウイルス科 長 主任
松本 和男 東方 美保	北陸福井地域担当 ウイルス検出・解析研究 協力研究者	福井県衛生研究所 同上	総括研究員 技師
春木 孝祐 勢戸 祥介 入谷 展弘	近畿大阪市地域担当 ウイルス検出・解析研究 協力研究者 協力研究者	大阪市立環境科学研究所 同上 同上	保健疫学課長 研究主任 研究員
山崎 謙治 依田 知子 左近 直美	近畿大阪府地域担当 協力研究者 協力研究者	大阪府立公衆衛生研究所 同上 同上	主任研究員 研究員 研究員
池田 義文 阿部 勝彦	中国広島地域担当 ウイルス検出・解析、研治岸養殖モニター 協力研究者	広島市衛生研究所 同上	専門員 技師
大瀬戸 光明 近藤 玲子 高橋 一博 吉田 紀美	四国愛媛地域担当 ウイルス検出・解析研究 協力研究者 協力研究者 協力研究者	愛媛県立衛生環境研究所 同上 同上 同上	微生物試験 室長 ウイルス科 長 主任研究員 主任研究員
大津 隆一 梶原 淳睦 村上 光一	九州地域担当 ウイルス検出・解析研究 協力研究者 協力研究者	福岡県保健環境研究所 同上 同上	ウイルス 課長 同課 研究員 病理細菌課 研究員
大野 惇 系数 清正 中村 正治	沖縄地域担当 ウイルス検出・解析研究 協力研究者 協力研究者	沖縄県衛生環境研究所 同上 同上	主任研究員 主任研究員 研究員
宇田川 悦子	全国情報集配事務 班総務・シーケンス解析	国立感染症研究所 ウイルス第2部	主任研究官
西尾 治	輸入食品のウイルス学的汚染調査 検出ウイルス確認試薬「ローブ」調製供給	国立公衆衛生院 衛生微生物学部	ウイルス室 長

平成11年度厚生科学特別研究班組織体制

研究者名	分担研究項目	所属施設	研究実施場所	職名
川本 尋義 葛口 剛 林菜穂子 神山 恵理 奈 柴田 伸一 郎 山下 照夫	厚生科学全 生食中研 性協力鎖遺 長協力鎖遺 環協力環協 協力環協	国ウイ 班長 研者子 究者解 者者者 者者者 者者者	岐阜県生物産業技術研究所 同上 同上 同上 名古屋衛生研究所 愛知県衛生研究所	部長研究員 研究員 主任研究員 研究員 研究員 主任
沢田 春美 吉澄 志 磨	北海道地 域出 核出 力研 協研	担当 者 者 者 者	北海道立衛生研究所 同上	疫学部 主任 研究員 研究員
斎藤 博之 三上 稔之 秋山 和夫	東北地 域出 核出 力研 協研	担当 者 者 者 者	秋田県衛生科学研究所 青森県環境保健センター 宮城県環境保健センター	主任 主任研究員 主任研究員
矢野 一好 関根 大正	東京都 水系 力研 協研	担当 者 者 者 者	東京都立衛生研究所 同上	主任研究員 研究科長
杉枝 正明	静岡中 部地 域出 核出 力研 協研	担当 者 者 者 者	静岡県環境衛生科学研究所	主幹
松本 和男 東方 美保	北陸福 井地 域出 核出 力研 協研	担当 者 者 者 者	福井県衛生研究所 同上	総括研究員 技師
春木 孝祐 勢戸 祥介 谷 展弘	近畿大 阪地 域出 核出 力研 協研	担当 者 者 者 者	大阪市立環境科学研究所 同上	保健疫学課 主任 研究員
山崎 謙治 依田 知子 左近 直美	近畿大 阪地 域出 核出 力研 協研	担当 者 者 者 者	大阪府立公衆衛生研究所 同上	主任研究員 研究員 研究員
池田 義文 阿部 勝彦	中国広 島地 域出 核出 力研 協研	担当 者 者 者 者	広島市衛生研究所 同上	専門員 技師
大瀬戸 光明	四国愛 媛地 域出 核出 力研 協研	担当 者 者 者 者	愛媛県立衛生環境研究所	微生物試験 室長
大野 惇 系数 清正 中村 正治	沖縄地 域出 核出 力研 協研	担当 者 者 者 者	沖縄県衛生環境研究所 同上	主任研究員 主任研究員 研究員
宇田川 悦子	シーケ ンエ ンス 班総 括助 務事 務	解析 事務 事務 事務	国立感染症研究所 ウイルス第2部	主任研究官
西尾 治	輸入食 品ウ イル ス汚 染調 査	調査	国立公衆衛生院 衛生微生物学部	ウイルス室 長
大山 徹	ウイル スマ 遺伝 子解 析	解析	東京農業大学 生物産学部	教授 (元道立衛生研究所)
大垣 真一郎 片山 浩之	汚染指 標と リ ス ク 評 価 関 係	評価 関係	東京大学大学院工学系 研究都市工学専攻 同上	教授 助手
大石 功二 中田 修 谷口 孝喜	研究オ ブ ザ ー バ ー 研究 オ ブ ザ ー バ ー 研究 オ ブ ザ ー バ ー	解析 事務 事務 事務	大阪府公衛研 大札幌田保 健小衛 生大医 学部	病理課長 講師 教授

平成11年度厚生科学特別研究事業厚生科学全国ウイルス性食中毒研究班  
研究班解析評価検討会議

- ・ 研究班会議 : 平成12年3月25日(土)・26日(日) 於 岐阜市
- 開催場所 : ホテル十八楼会議室(芙蓉)  
〒500-8009 岐阜市湊町10番地  
TEL 058-265-1551 FAX 058-263-7518
- ・ 会議出席対象者 : 主任研究者、分担研究者、協力研究者等

議題

平成12年3月25日(土曜日:午後1時~5時30分)

厚生科学特別研究班長 挨拶:川本

ウイルス性食中毒遺伝子検査法標準化総括 座長:川本  
討論:分担研究者・協力研究者

平成11年度厚生科学特別研究事業報告 班員:分担研究者  
各分担研究者:研究概要と地域特性の報告  
全国NLV(SRSV)遺伝子解析概況報告(分担研究者)

P/Y系プライマーのNLV増幅検出効率性の検討  
座長:川本班長 コメンテーター:大山 東京農大教授  
環境水系と陸上ヒト社会の検出ウイルス遺伝子特性比較  
研究班"ユニバーサル"プライマー

ICTV新ウイルス属命名への提言と食品衛生法との関連について  
分類命名についての経緯説明  
座長:川本班長 コメンテーター:田中 札幌大小児科講師  
大石 大阪公衛研課長

初日閉会

平成12年3月26日(日曜日:午前9時~午後12時30分)

環境水系SRSV生態学とそのリスク評価  
座長:川本班長  
プレゼンテーター:分担研究者2名  
1 矢野 東京都衛生研究所主任研究員  
「水中ウイルス濃縮精製検出法」と「リスク評価」  
2 片山 東京大学大学院工学研究科助手  
「陸水系ウイルスと従来汚染指標・大腸菌群/ファージ  
分布との比較解析」

今後の将来研究展開アクションプログラム  
座長:川本班長 フリー討論  
コメンテーター:谷口 藤田保健衛生大教授

研究班成果公開状況報告  
学会発表予定 日本臨床ウイルス学会、日本ウイルス学会  
日本土木学会、その他  
論文発表投稿 投稿中 J.Med.Virol.、感染症学会誌

閉会

# 学会報告抄録集

## Case Study of food poisoning: Detection of Human Calicivirus Genes from Feces of Patient, and Cook, and Food

Shin-ichiro Shibata<sup>1</sup>, Makoto Kawahara<sup>1</sup>, Masataka Futohashi<sup>1</sup>, Hiroyoshi Kawamoto<sup>2</sup>, and Masao Imai<sup>1</sup>

1, Nagoya City public Health Research Institute, Mizuho-Ku, Nagoya 467-8615, and 2, Department of Molecular Microbiology, Gifu Prefectural Institute for Bioindustrial Technology, Minokamo, Gifu 505-0004, Japan

A case of food poisoning involving 7 patients occurred in Nagoya city of Japan at 14:00 on January 30, 1998. The epidemiological survey revealed that the patients took common food in a certain restaurant around 17:30 on January 29. The bacteriological examination was all negative. Viral gastroenteritis was suspected from both the incubation time and specific symptoms such as nausea, vomiting, intense diarrhea and so on. Since we didn't detect A group, C group rotavirus, or Adenovirus type 40/type 41, human calicivirus infection seemed most likely. We tried to detect the human calicivirus genes by the amplification RT-PCR method. Although we failed to detect the genes in the 1st PCR with the primers, #35/#36, the nest PCR with the #81/#NW82/#SM82 mixture primers to the 1st PCR amplicons was successful and the human calicivirus genes were detected in the feces of 4 of 6 patients and the feces of one cook of the restaurant. Furthermore we detected the genes in the skinned squid without innards, which was the remains of the food served on that day and kept in a freezer in the restaurant. Then we determined the sequences of the genes. When compared with the database registered to DDBJ, EMBL, or Genbank, the genes turned out to be close to accession number L25114 and thus to belong to the genogroup 2. As the results of the alignment, the genes that derived from the food, and the feces of our patients and the cook were found to have the same sequence. From these information, this case of food poisoning by a cook of the restaurant, a carrier of human calicivirus.

## Detection of Norwalk-like virus genes in the caecum contents of pigs

M. Sugueda<sup>1</sup>, K. Sahara<sup>1</sup>, H. Nagaoka<sup>1</sup>, Y. Kakishima<sup>2</sup>, H. Kawamoto<sup>3</sup>, S. Nakamura<sup>1</sup>, and S. Nakajima<sup>4</sup>

1, Shizuoka Prefectural Institute of Public Health and environmental science, Shizuoka-shi, Shizuoka 420-8637, Japan, 2, Shizuoka City Institute of Public Health, Shizuoka, Japan, 3, Department of molecular Microbiology, Gifu Prefectural Institute for bioindustrial Technology, 4, National Institute of Public Health, Tokyo 108-8638, Japan

Norwalk-like virus (NLV) genes were detected by RT-PCR in the caecum contents of 6-months pigs that were brought in a slaughterhouse in Shizuoka prefectural in Japan. Positive PCR products were produced from five out of 1605(0.3%) samples by nested PCR using human SRSV primers. Nucleotide sequences between 4573 and 4864 region were determined. Between the Norwalk virus sequence and the sequences detected in pigs, there were 58.2% to 59.9% sequence homology. The swine sequences were located on genogroup 2 of human SRSVs, but forms a subgroup in the phylogenetic tree of caliciviruses. The detection of NLV genes in pigs raises a possibility of the contribution of swine population to the resources of human SRSV genes.



X I t h International Conference of Virologists Societies; Sydney, Australia, 9-13 August 1999

### A nation-wide survey of food-borne viral gastroenteritis for human caliciviruses (HuCVs; small round structured viruses; SRSVs, Norwalk-like viruses; NLVs) in Japan

Hiroyoshi Kawamoto<sup>1</sup>, Harumi Sawada<sup>2</sup>, Hiromasa Sekine<sup>2</sup>, Sinichiro Shibata<sup>2</sup>, Takahiro Haruki<sup>2</sup>, Kazuo Akiyama<sup>2</sup>, Yoshifumi Ikeda<sup>2</sup> and Ryuichi Otsu<sup>2</sup>

1, Gifu Prefectural Institute for Bio-Industrial Technology, and Director General of the Japanese Government Granting Health Science Special Research Project

2, Hokkaido, Tokyo, Nagoya, Osaka, Miyagi, Hiroshima and Fukuoka local Institute of Health; Working group of nation-wide survey project for viral gastroenteritis outbreaks in Japan

We conducted a nation-wide survey project and a network for viral gastroenteritis outbreaks from Okinawa (the most southern area) to Hokkaido (the most northern area) in Japan. SRSVs are usually prevailing as causative agents of food borne poisoning cases concentrated in winter and also sharing 90% or over among viral agents. We tentatively computed for data summations of which 902 viral specimens collected from 359 outbreaks in nine different areas were examined by electron microscope (EM) and/or reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) during the last 27 months. As the results, it became clear that SRSVs had a short prevailing period just before group A human rotavirus epidemics among infants. On the other hand, food-borne viral gastroenteritis seasonally distributed as 16% in spring, 9% in summer, 13% in autumn and 62% in winter, respectively. An occurrence index of the outbreak was calculated as 0.48 (average), 1.45 (Tokyo) and 1.52 (Osaka) cases/100,000 persons/year, respectively. A detection rate was 55% by EM and 58% by RT-PCR, respectively. Of RT-PCR positives, southern hybridizations using of P1a, P1b, P2a, and P2b proves previously reported showed an enforcement rate in 44% as genogroup typing. The typing rate of genogroup (G) among domestic SRSVs was 0.5%/G1, 57%/G2 and 42.5%/not type, respectively. However, it was still remained not typing PCR products of 30% by RT-PCR (#35/36NLV, MR3/4, #81/82NLV/82SM, and Yri22F/R). Therefore, it had to be developed to the most critical genodiagnosics for domestic SRSVs in Japan. Finally, we propose a revision RT-PCR using new primer set designed from analysis among domestic 171 genomic collections sequenced by us from 1989 to 1998. Our nation-wide survey project is supporting by national grant of health science special research, and composed by Japanese virologists of 18 local Institute of Health (Hokkaido, Aomori, Akita, Miyagi, Nigata, Tokyo, Yokohama city, Shizuoka, Aichi, Nagoya city, Gifu, Fukui, Osaka, Osaka city, Hiroshima city, Ehime, Fukuoka and Okinawa), National Institute of Infectious Diseases and National Institute of Public Health.

### Sequence diversity of human caliciviruses (HuCVs) from samples in non-bacterial gastroenteritis outbreaks in Japan, 1989 to 1998

Hiroyoshi Kawamoto<sup>1</sup>, Tohru Ohyama<sup>2</sup>, Kenji Yamazaki<sup>2</sup>, Shousuke Seto<sup>2</sup>, Hiroyuki Saito<sup>2</sup> and Etsuko E. Utagawa<sup>2</sup>

1, Gifu Prefectural Institute for Bio-Industrial Technology, and Director General of the Japanese Government Granting Health Science Special Research Project

2, Hokkaido, Osaka, Osaka city, Akita local Institute of Health and NIH/JPN; Working group of nation-wide survey project for viral gastroenteritis outbreaks in Japan

We determined the nucleotide sequences of RT-PCR products amplified from the RNA polymerase region of the HuCV genomes in fecal, vomit and oyster samples from the non-bacterial gastroenteritis outbreaks in Japan, 1989 to 1988. The sequences of different strains revealed great heterogenicity, with a range of 60 to 100% homology among strain. The sequences were compared with the sequence of reference viruses for the genetic characterization of viruses prevailing in Japan. Of the 171 different HuCVs found, approximately 90% of the genes could be classified into Snow Mountain like viruses (genogroup type 2; G2) and other strains as Norwalk like viruses (genogroup type 1; G1) based on genotyping with homology analysis. Furthermore, the strains belonging to the G2 could be classified into 4 additional subgroups or over, which we tentatively designed subgroups, 2A to 2D or alone 2E, with more than 93% homology in amino acid among strains.

We believe that two subgroups of 2C to 2D or alone 2E should make it possible to be new specific subgroups (JPN-1, 2) in the G2 in Japan from the phylogenetic and pairwise comparison studies. No strains belonged to human Sapporo-like virus (genogroup 3; G3). Simultaneous infection with different genogroups was found in the same patients or the same outbreaks and was likely to be due to contact with contaminated oysters or other food or due to person-to-person spread. The results obtained in this study should not only provide information on the diversity of strains causing outbreaks in Japan, but also we could propose new universal primer set designed on the basis the alignments of 171 nucleotide sequences for facilitating the most critical detection of almost HuCVs prevailing in Japan.

第74回日本感染症学会 (平成12年4月20~21日 福岡市)

RT-PCR法による小児急性胃腸炎症例からの小型球形ウイルスの検出成績

小島 禎<sup>1)</sup>、柿島博志<sup>1)</sup>、手嶋力男<sup>2)</sup>、川本尋義<sup>3)</sup>、宇田川悦子<sup>4)</sup>

栄研化学<sup>1)</sup>、手嶋小児科医院<sup>2)</sup>、岐阜県生物産業技術研究所<sup>3)</sup>、国立感染症研究所<sup>4)</sup>

【はじめに】 近年、小児の急性胃腸炎起因ウイルスである小型球形ウイルス {SRSV:(Norwalk-like Virus; NLV,Sapporo-like Virus;SLV)} の遺伝子配列が多数解読された結果、RT-PCR法をもちいた遺伝子検出が可能となってきた。我々は、小児医院を対象として過去1年間に非細菌性、非ロタウイルス性、非アデノウイルス性下痢症と診断された患児由来便と健常児由来便から下痢症ウイルス検索を行った。

【材料と方法】平成10年10月から平成11年3月に来院し上記ウイルス性以外の下痢症と診断された小児77例と健常児128例の糞便を材料とした。糞便は10%乳剤にし、ISOGEN-LS (ニッポンジーン)を用いてRNA抽出を行った。NLVはMR3/MR4プライマーで1st-PCRを行い更にNV81/NV82/SM82プライマーを用いたnested-PCRを行った。更に、最近試作されたNLV (GI,GI)共通プライマーでも検査を行った。SLVは新に作成したプライマー及びAstrovirusについてはAC4/AC6プライマーでRT-PCRを行った。塩基配列の解析はダイターミネーター法を用いて行った。

【結果】胃腸炎症例72検体の検査の結果、RT-PCR法ではNLVの1st-PCR用MR3/MR4プライマーで8検体(11%)、NestedプライマーNV81/NV82,SMV82で16例(22%)、またNLV (GI,GI)共通プライマーでは14例(19%)が陽性であった。NLVはMR3/MR4プライマーで1st-PCR陽性例は全てNLV (GI,GI)共通プライマーでも検出された。更にこれらのPCR産物の塩基配列を調べた結果殆どがGI型であった。また、AstrovirusはNLV陰性検体から5例(7%)が検出された。一方、健常者においてはNestedプライマーNV81/NV82,SMV82でのみ1例(0.8%)陽性を示した。

【考察】今回調査した小型球形ウイルスの検査は、RT-PCRが一般的で、臨床検査ではほとんど行われていない。しかし、上記調査結果から小児下痢症診断においてNLV,SLV及びAstrovirusも十分に考慮に入れる必要があると考えられた。

第41回日本臨床ウイルス学会 (平成12年5月25日~26日 広島市)

ノーウォーク様カリシウイルス (NLV) をパラメータとした環境分子疫学

川本尋義 (厚生科学特別研究班長、岐阜県生物研)、宇田川悦子 (国立感染研)、山崎謙治 (大阪公衛研)、杉枝正明 (静岡環衛研)、池田義文 (広島市衛研)、大山 徹 (東京農大・生物産業学部)

#### 【目的】

NLVはカリシウイルス科属名としてまだ国際分類も確定していない。更に、電顕形態学総称で曖昧な小型球形ウイルス (SRSV) という表記も、ウイルス汚染からの「食の安全と直接健康被害防止対策」を目的に食品衛生法が改正されて日が浅く (H9)、当面行政で継承されると思われる。我々はこれまでにウイルス性食中毒、胃腸炎患者、食品等から高感度にNLV遺伝子を検出するRT-PCR法と診断プライマーの開発を行ってきた。ヒト排泄NLVが海洋汚染に繋がっていく水系NLV動態は明らかでなく、開発したRT-PCR法によるヒト・食品・汚水等環境水系からの検出NLV遺伝子解析を通じウイルス動態を探ることが本研究目的である。

#### 【材料と方法】

ウイルス検出材料はウイルス性食中毒食品・ヒト糞便・汚水河川水等環境水。ウイルス検出系は厚生科学全国ウイルス性食中毒研究班RT-PCR法を用い、クローニング後遺伝子配列決定し、それらを比較解析した。当班設計のP1~3/Y1~2系のNLV検出汎用プライマーはJ.Med.Virolに現在投稿中である。P2, P3とY2はアンチセンスでRTは主にP3で、P1/2 or Y1/2でPCRを行い検出確認される。これらは1989年以降の国内検出NLV6千余株から事例代表株から選別しORF1の遺伝子配列決定177株の相同性をもとに設計された。今、研究や食品衛生行政対応のための実用使用許可の希望が研究班に多く寄せられてきている。

#### 【結果および考察】

NLVはヒト社会で乳幼児小児を中心に冬季 (主に11~翌3月) に自然流行し、ウイルス性食中毒もそれら流行周期と密に連動するらしい。国内検出NLVの約8割は遺伝子群型ではG2に属しこれらは更に亜群5種に分別可能で、日本の特徴的亜群は2種。元祖のNV (ノーウォークウイルス) 型G1は国内で約2割以下と低出現傾向。それなのにNLVという属称表記に些か抵抗も感じている。ただ驚くべきは、今回の環境水系生態調査でNLVが陸の流行よりも長いスパンで季節を問わず検出され続けていること。われらはこれまでNLVを食品衛生疾病関連として臨床病理学的観点から観察し続けたが、生態としてはむしろ不顕性宿主からの水平伝播循環が主で重篤症状も少ないウイルスかも知れない。ウイルス性食中毒は依然成人に多く生牡蠣が主原因であることに従来と違いはない。だが、非牡蠣関連食中毒事件でもNLVが検出される事例も多く食品衛生監視は重要である。だが、NLV研究が開始されて以来、NLVによる致死報告に未だ接しないことに安堵を覚えるのは、筆者らばかりでないだろう。NLV国内侵淫は全国にわたり、ヒト糞便由来NLVの水系汚染とその生存・残留も相当長期間に及ぶと推定された。それ故、ウイルス環境生態学の認識積み上げとウイルス制御への研究展開も今日必要と考える。

なお、本広域研究は厚生科学特別研究事業「厚生科学全国ウイルス性食中毒研究班」として地方衛研 (北海道、青森、秋田、宮城、東京、静岡、愛知、名古屋市、岐阜、福井、大阪府・市、広島、愛媛、福岡、沖縄) との共同研究。一方、東大大学院工学研究科都市工学専攻大垣教授らとは現在岐阜県科学技術振興プロジェクト研究 (県独自事業) として展開中。環境リメディエーション生物工学的研究は岐阜生物研葛口剛 (Ph.D.)、林 菜穂子・神山恵理奈ら研究員の協力と努力に感謝する。

### 生活環境水中におけるヒト腸管感染ウイルスの検出

○杉枝正明、佐原啓二、三輪好伸、長岡宏美、秋山真人、宮本秀樹  
(静岡県環境衛生科学研究所)

宇田川悦子(国立感染症研究所) 川本尋義(岐阜県生物産業技術研究所)

#### 【目的】

水系の微生物学的安全性を評価する上で、生活環境へ排泄され、環境水中に混入してゆくヒト腸管系の病原ウイルスの存在を確認することは、ウイルス感染を防止する意味で重要であるが、その実態については殆んど明らかにされていない。腸管感染ウイルスは、ヒトの腸管で増殖し、糞便と共に数週間にわたり体外に排泄され、生活環境での処理が不完全な場合、ウイルスが下水、下水処理水、河川、湖沼、海域などに放流され、ヒトに対して食品等による直接健康被害を及ぼす可能性がある。そこで生活環境水が集中する下水処理施設におけるヒト腸管感染ウイルスの検出を試みた。

#### 【材料と方法】

検査材料は、1999年 8月~12月の期間に、静岡市内のS下水処理施設(分流式)で、未処理下水および処理下水(放流水)を各 20 L 毎月採取した20検体を用いた。これらの検体はセルロース・吸着凝集法を用いて現場で濃縮した。

ウイルス分離は、HEp-2, RD-18s, Vero 細胞の 3種類を用いて、4継代培養し、中和試験により、ウイルス分離株を同定した。

細胞培養が確立されていないノーウォーク様ウイルス(NLVs)は、RNA ポリメラーゼ領域で構築された 3組のプライマー [a:35/36(1st)→NV81/NV82, SW82(Nested), b:MR3/4(1st)→Yuri22F/R(Nested), C:Y1/Y2((1st)→Y1/Y2(Wabble)] 系を用いた。また検出された遺伝子の PCR産物はダイレクトシーケンスを行い塩基配列を決定した。

#### 【結果】

1999年 8月~12月の期間に、下水処理場の未処理下水(10 検体) および処理下水(10 検体) の計20検体を調査し、各下水からコクサッキーB群ウイルス 5型が検出された。また NLVs遺伝子検索では、 aおよび b系プライマーによるNested PCRで継続的に検出された。その遺伝子型はGenogroup IIに分類され、群内には更に 2種類の亜群が認められた。

#### 【考察】

ヒトの生活環境下では、毎年異なるウイルス感染症が流行し報告されているが、ヒト排泄物等から混入しているウイルスの実態を継続的に把握した報告例はみられない。

今回の調査で環境水中にヒト腸管系の病原ウイルスの存在を確認した。環境水が魚介類等を汚染し、ヒトに及ぼす健康影響が考えられることから、その対策の必要性が示唆された。

(本研究は平成11年度厚生省厚生科学特別研究事業により支援実施された。)