

厚生科学研究費補助金  
生活安全総合研究事業

研究課題名  
食品中の微生物汚染状況の把握と安全性の  
評価に関する研究

平成 13 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 西尾 治 (国立公衆衛生院)

平成 14 年 3 月

## 目 次

### I 総括研究報告

- 食品中の微生物汚染状況の把握と安全性の評価に関する研究 -----1  
西尾 治

### II 分担研究報告

1. リアルタイム PCR 法による A 型肝炎ウイルス検出法の開発 -----15  
西尾 治
2. リアルタイム PCR 法によるサッポロウイルス検出法の開発 -----20  
西尾 治
3. 海水の濃縮法に関する研究 -----25  
西尾 治
4. 輸入食品のウイルス汚染状況に関する研究 -----29  
西尾 治
5. 食品を介した食中毒様集団発生および食品のウイルス汚染状況に関する研究 -----34  
西尾 治
6. PCR による検査法の評価、食品中のウイルス汚染状況に関する研究 -----44  
春木 孝祐
7. 食品中の微生物汚染状況の把握と安全性の評価に関する研究 -----47  
西 香南子
8. 海域のウイルス汚染ならびに食品媒介ウイルス感染症の集団発生に関する研究 -----52  
新川 奈緒美
9. 輸入食品のウイルス汚染状況の把握と食品からのウイルス検出法の検討に関する研究 -----61  
大瀬戸 光明
10. 輸入、国内の食品および環境中のウイルス汚染に関する研究 -----70  
杉枝 正明

11. 輸入、国内の食品および環境中のウイルス汚染に関する研究	76
古屋 由美子	
12. 輸入、国内の食品および環境中のウイルス汚染に関する研究	81
長谷川 斐子	
13. 輸入、国内の食品および環境中のウイルス汚染に関する研究	84
藤本 嗣人	
14. ベトナム小児における Norwalk-like virus 感染に関する研究	88
牛島 廣治	
15. 保育施設におけるウイルス性胃腸炎の前向き研究とアストロ ウイルス、ノーウォークウイルスの分子疫学に関する研究	90
牛島 廣治	
16. 輸入、国内の食品および環境中のウイルス汚染に関する研究	93
鈴木 宏	
17. 食品中の大腸菌汚染状況の把握と安全性の評価に関する研究	99
伊藤 健一郎	
III 付録 ノーウォークウイルス検査法マニュアル	123
IV 付録 陰電荷膜を用いた海水からのウイルス濃縮法マニュアル	147

**I**

**厚生科学研究費補助金  
(生活安全総合研究事業)**

**食品中の微生物汚染状況の把握と安全性の評価に関する研究**

**平成 13 年度 総括研究報告書**

**主任研究者 西尾 治 (国立公衆衛生院)**

## 厚生科学研究費補助金（生活総合安全研究事業）

### 総括研究報告書

#### 研究課題名：食品中の微生物汚染状況の把握と安全性の評価に関する研究

主任研究者 西尾 治（国立公衆衛生院 ウイルス室長）

#### 研究要旨

本研究は食品の微生物学的安全性の確保により国民の健康増進を目的として遂行した。食品中のウイルス定量を目的として、ノーウォークウイルス、A型肝炎ウイルス、サッポロウイルスのリアルタイムPCR法の改良・確立を行い、リスク評価が行える検査法を確立した。海水からのウイルス濃縮法を検討したところ陽電荷膜法よりも陰電荷膜法が6倍程度優れていた。

国産二枚貝の汚染実態解明として、生カキでは25%、ヒオウギ貝は4%からノーウォークウイルスが検出されたが、ホタテ貝は陰性であった。また全ての二枚貝はA型肝炎ウイルス陰性であった。二枚貝の養殖海域からウイルスを検出できなかったが、その海域の二枚貝およびプランクトンはウイルス陽性の時も見られた。

東南アジアからの輸入二枚貝は240件中32件（13%）からノーウォークウイルスが、中国産のハマグリ2件およびウチムラサキ貝1件からA型肝炎ウイルスが、北朝鮮産ハマグリ1件からサッポロウイルスが検出され、この貝はノーウォークウイルスにも汚染されていた。また、中国産ハマグリ1件から組織培養法でウイルスが分離されたが、ポリオウイルスは否定された。従って輸入二枚貝は240件中35件（15%）がウイルスに汚染していた。エビでは23件中2件（9%）からノーウォークウイルスが検出された。輸入魚介類の喫食に際しては十分に加熱することにより感染防止ができるので、衛生教育が必要である。

ウイルス性食品媒介集団発生84事例調査では98%がノーウォークウイルスによるもので、1事例は中国産ウチムラサキ貝によるノーウォークウイルスとA型肝炎ウイルスの混合汚染であった。原因食材ではカキが37%で最も多く、その他にウチムラサキ貝、アサリ、バイガイ、ミル貝等の二枚貝も見られた。患者とカキから検出されたノーウォークウイルスでは遺伝子型が多様であったものの、患者とカキで同一のものも認められ、カキとの関連性が強く示唆された。カキ等二枚貝のウイルス学的安全性の確保には浄化槽の整備等の河川・海水のウイルス汚染防止対策が不可欠で、総合的な対策が必要である。

乳幼児の間でノーウォークウイルスの流行が起きており、食中毒事例と同様な遺伝子型が検出され、食品汚染との関連性が示唆された。

食品を介する集団発生の危機管理として地図情報システムの応用について検討を行ったところ、この方法は感染源の追跡、感染拡大防止に有効な手段であると考えられた。

下痢原性大腸菌の現在の検査法は完全なものでなく、局在性、凝集性及び拡散性付着性大腸菌の病原関連遺伝子 13 種類を検査できるようにした。これら細菌によって食品汚染がおこる危険性があるので、これらの細菌を確実に診断できる検査法を早急に確立する必要がある。

わが国のウイルス性食中毒集団発生の多くはカキ等の二枚貝が原因となっている。生カキ等のリスク評価が達成され、安全性が確保されればウイルス性食中毒事例の約 40%は防止できると予測される。そのためにはヒトのふん便から排泄されるウイルスによる河川、海水の汚染と二枚貝におけるウイルス蓄積・濃縮の関連性を総合的に研究するとともに、原因食品のウイルス量と発病におけるリスク評価を行うことが緊急課題と考えている。

さらに A 型肝炎ウイルスおよびノーウォークウイルス等が食品を介してわが国に入り込んでいるので、輸入生鮮魚介類のウイルス学的安全性を確保する監視体制の整備が必要である。

#### 分担研究者

伊藤健一郎

国立公衆衛生院衛生微生物学部

細菌室長

牛島廣治

東京大学医学部大学院研究科 教授

長谷川斐子

国立感染症研究所

感染症情報センター 主任研究管

鈴木 宏

新潟大学医学部公衆衛生学講座

教授

藤本嗣人

兵庫県衛生研究所微生物部

主任研究員

大瀬戸光明

愛媛県立衛生環境研究所

微生物試験室 室長

杉枝正明

静岡県環境衛生科学研究所微生物部

主幹

古屋由美子

神奈川県衛生研究所ウイルス部

専門研究員

春木孝裕

大阪市立環境科学研究所

保健疫学課長

西 香南子

三重県保健環境研究所 研究員

新川奈緒美

鹿児島県環境保健センター

主任研究員

## 研究協力者

秋原 志保

東京大学大学院

医学系研究科発達医科学

稲吉 恵

静岡県環境衛生科学研究所

微生物学部

入谷 展弘

大阪市立環境科学研究所

沖津 祥子

東京大学大学院

医学系研究科発達医科学

川本 歩

鳥取県衛生研究所微生物部

福田 伸治

広島県保健環境センター

西田 知子

山口県衛生公害研究センター

三上 稔之

青森県環境保健センター

徳竹 由美

長野県衛生環境研究所

木村 博一

群馬県衛生環境研究所微生物部

倉園 貴至

埼玉県衛生研究所感染症担当

斎藤 玲子

新潟大学医学部公衆衛生学

坂井 胤

新潟大学医学部公衆衛生学

佐原 啓二

静岡県環境衛生科学研究所

微生物学部

篠川 旦

新潟県保健環境科学研究所

ウイルス科

勢戸 祥介

大阪市立環境科学研究所

田中 俊光

千葉市食品検査所

中嶋 洋

岡山県環境保健センター微生物科

西川 眞

新潟県保健環境科学研究所微生物部

森屋 一雄

佐賀県形成薬業センター微生物課

山崎 貢

愛知県衛生研究所

微生物部環境微生物科

古田敏彦

浜松市保健環境研究所

秋山 美穂

国立公衆衛生院微生物学部

加藤 由美子

国立公衆衛生院微生物学部

## A. 研究目的

わが国では平成9年から食中毒原因物質に小型球形ウイルス、その他のウイルスが加えられ、食中毒事例についてウイルス検査が行われ、報告数が多くなってきている。その結果平成12年度原因物質別では小型球形ウイルス（ノーウォークウイルス）による患者数が第2位で、平成13年度は第1位で最も多くなっている。従って、食品によるウイルス性食中毒様集団発生の防止が急務であり、社会的な問題となっている。

国産生食用生カキの出荷量は約 30 万トン/年以上であり、東南アジアから生鮮魚介類の輸入量は 33 万トン/年と膨大な量である。しかしこれら食品におけるウイルス学的な安全性は国産カキでノーウオークウイルスについて一部が行われているに過ぎず、その他の二枚貝および輸入魚介類では全くと言ってよいほどなされていない。

そこで、上記食品のウイルス汚染実態解明としてウイルス性食中毒で最も重要なノーウオークウイルス、乳幼児下痢症で重要なサッポロウイルス、A 型肝炎ウイルスは日本を除く東南アジアでは依然とし汚染地帯であり、食品とともに入ってくる危険性が高いので対象とした。さらに野生ポリオウイルスは西太平洋地域では撲滅されたものの、依然としてアジア、アフリカ地域等では存在しているので、ポリオウイルスを含むエンテロウイルス、アデノウイルス等の汚染状況を把握することにした。

さらに、食品中のウイルスの安全性評価にウイルスの検出・定量が行えるリアルタイム PCR 法を導入し、ノーウオークウイルス、サッポロウイルスおよび A 型肝炎ウイルスの食品中の汚染を定量的に把握し、安全性評価の基礎データを蓄積することとした。

海水中のウイルス量は極めて少ないので、効率よくウイルスを濃縮する方法の検討を行い、二枚貝の養殖海域およびプランクトンのウイルス汚染実態を解明し、養殖カキを始めとする海域

での二枚貝のウイルス汚染との関連性を追求した。また、河川および海水汚染の汚染源と考えられる乳幼児における上記ウイルスの感染、ウイルス排泄状況についても研究した。

さらに、わが国における食品媒介ウイルス性食中毒様集団発生状況を調査し、その発生状況から、疫学調査、原因食品並びに原因ウイルスの特定および分子疫学的解析から、今後の食中毒事例発生の防止策の樹立を目的とした。

食中毒事例発生時の危機管理、感染拡大防止のための、地図情報システムによる食品汚染の危機管理シミュレーションの予備調査を行い、今後の集団発生時における危機管理システムを構築する。

大腸菌においても下痢原性大腸菌の新しいカテゴリーとして提唱されている局在性および凝集性付着大腸菌の病原性はまだ明快ではない。また、食品の本菌による汚染状況の調査もほとんどされていない。本研究では病原性散発性下痢症患者由来大腸菌 1,588 株および健康者由来大腸菌 61 株について遺伝子学的検討および生物学的検査法の確立と食品における汚染状況を把握することを目標とした。

これにより、食品における微生物汚染による健康被害リスクの的確な評価方法および拡大防止策を確立し、食品の微生物学的安全性の確保と国民の健康増進に寄与するものである。



## B. 研究方法

### 1. 検査法の確立

ウイルス学的安全性評価のためのウイルス定量を目的としてサッポロウイルス並びに A 型肝炎ウイルスは遺伝子配列からプライマー並びにプローブを設定し、リアルタイム PCR 法を確立し、RT-PCR 法と比較検討した。ノーウオークウイルスは電子顕微鏡でウイルス粒子が確認できたにも拘わらず、リアルタイム PCR 法で陰性のものについて遺伝子配列を調べ、プローブとプライマーの設定を行った。

最近になり海水からのウイルス濃縮法で、陰電荷膜を用いた方法が効率の良いことが報告されたので、その方法について検討した。

### 2. 国内産二枚貝におけるウイルス汚染実態調査

生カキ 244 件、ヒオウギ貝 25 件およびホタテ貝 12 件についてノーウオークウイルスおよび A 型肝炎ウイルスについてリアルタイム PCR 法でウイルス汚染状況を定量的に調査した。

### 3. 環境中のウイルス汚染実態

河川水 1 地点、二枚貝養殖海域の海水 4 地点、プランクトンは 5 地点で原則として月 1~2 回採取しウイルス汚染の検査を行った。

### 4. 輸入魚介類におけるウイルス汚染実態調査

輸入魚介類は主に中国、韓国、北朝鮮からの二枚貝（ハマグリ、アカガイ、アサリ等）240 件、およびアメリカ産カキ 4 件、インドネシア、インド、フ

イリピン、ベトナム、ミャンマーからのエビ類 24 件、計 268 件について、ノーウオークウイルス、サッポロウイルス、A 型肝炎ウイルスの検出をリアルタイム PCR 法および RT-PCR 法で実施し、さらに 3 種類の細胞を用いてウイルス分離試験を行った。

### 5. 食品媒介集団発生状況

食品媒介集団発生 84 事例を調査した。84 事例からの患者便 723 件（なお、ふん便材料は本人の了解の基に提供された。またウイルス検査にのみ用いることで了解を得ている。ふん便材料に氏名は特に記載しない等、個人が特定されないように配慮した）は従業員ふん便 98 件、吐物 10 件および原因食品 12 件についてウイルス学的検索を行った。

遺伝子配列の決定は NV 陽性の PCR 産物を用いダイターミネーター法で食中毒 18 事例からのふん便 94 件、カキ 21 件からおよびウチムラサキ貝 2 件、小児の下痢症患者ふん便 9 件、計 126 件について検討した。

### 6. 日本およびベトナムでの乳幼児におけるノーウオークウイルス感染と分子疫学的解析

日本の保育園児 44 名を 14 ヶ月の間連続して採取したふん便 921 件およびベトナムの乳幼児下痢症患者からのふん便 337 件を用い、ノーウオークウイルスを含む下痢症ウイルスの検出と分子疫学的解析を行った。

### 7. 地図情報システムによる食品汚染の危機管理シュミレーション

危機管理シュミレーションとして食品中毒様集団発生、小児急性胃腸炎およびふん口感染する無菌性髄膜炎をモデルとして検討した。

#### 8. 下痢原性大腸菌の遺伝子診断法の確立

下痢原性大腸菌の新しいカテゴリーとして提唱されている局在性及び凝集性付着大腸菌の病原性はまだ明らかではない。また、食品の汚染状況の調査もほとんどされていない。初年度は散发性下痢症患者由来大腸菌 1,588 株および健康者由来大腸菌 61 株について遺伝子学的および生物学的検査法を検討した。

### C. 研究結果

#### 1. 検査法の確立

A 型肝炎ウイルスおよびサッポロウイルス検出におけるリアルタイム PCR 法のプライマーとプローブを設定し、RT-PCR 法との比較のために患者のふん便を用いて検討したところ、リアルタイム PCR 法は RT-PCR 法の 1st PCR 法よりも 100 倍程度検出感度が高かった。また、現在用いているノーウオークウイルスのリアルタイム法はアルファトロントタイプを検出することができないことが明らかとなったので、そのタイプの遺伝子配列を決定し、リアルタイム PCR 法のプライマーとプローブを設定した。

海水の濃縮法では陰電荷膜法が陽電荷膜法よりもかなり優れていた。

#### 2. 国内産二枚貝におけるウイルス汚

#### 染実態調査

ノーウオークウイルスは国内産生カキ 244 件中 40 件 (16%) がリアルタイム PCR 法で陽性であった。40 件中 18 件 (45%) はカキ 1 個当たりのノーウオークウイルスのコピー数が 200 個から 999 個で、22 件は 1,000 個以上であった。また、リアルタイム PCR 陰性で RT-PCR 陽性が 21 件 (9%) に認められ、リアルタイム PCR 陽性と合わせると、生カキのノーウオークウイルス陽性は 25%であった。

ヒオウギ貝では 25 件中 1 件がノーウオークウイルス陽性で、ウイルスコピー数は 907 個であった。

ホタテ貝 12 件はノーウオークウイルス陰性であった。なお、全ての二枚貝は A 型肝炎ウイルス陰性であった。

#### 3. 環境中のウイルス汚染実態調査

河川水は平成 12 月から平成 14 年 3 月の間で、13 回のうち 8 回はノーウオークウイルスが認められ、ウイルスコピー数は 2~2,200 個/ml であった。海水は調査した 5 地点でノーウオークウイルスは検出されなかった。

プランクトンは平成 13 年 12 月から平成 14 年 3 月の間で調査し、12 月では 5 地点からのプランクトンが全てノーウオークウイルス陽性で、他の月は全て陰性であった。

#### 4. 輸入魚介類におけるウイルス汚染実態調査

ノーウオークウイルスは中国産二枚貝 122 件中 22 件 (18%)、韓国産二枚貝 84 件中 7 件 (8%)、北朝鮮産二枚貝 34

件中 6 件 (18%) から検出された。

アメリカ産カキ 4 件は陰性であった。インドネシア、インド、フィリピン、ベトナム、マレーシア、ミャンマー産のエビ類 26 件のうちインドネシア産 2 件 (8%) からノーウオークウイルスが認められた。

A 型肝炎ウイルスは中国産ハマグリ 2 件とウチムラサキ貝 1 件から検出され、いずれも遺伝子解析の結果 1A 型であった。サッポロウイルスは北朝鮮産ハマグリ 1 件から検出されたがノーウオークウイルスにも汚染されていた。

組織培養法の Hep2 細胞で中国産ハマグリ 1 件からウイルスが分離されたが、ポリオウイルスは否定された。

## 5. 食品媒介集団発生状況

ウイルス性食品媒介集団発生は 84 事例を調査し、喫食者数は 5,055 名で発症者は 2,029 名 (40%) であった。発生場所は旅館・飲食店が 50 事例 (60%) で最も多く、次いで家庭の 9 事例であった。その他に保育園・幼稚園が 5 事例、小学校および高等学校が各 1 事例等で見られた。原因食品は不明が 43 事例、カキが 31 事例 (37%) で、ウチムラサキ貝 2 事例、アサリ・アマエビ、バイガイ、ミル貝が各 1 事例であった。84 事例の患者ふん便 723 件中 434 件 (60%) からノーウオークウイルスが、ふん便 4 件から A 型肝炎ウイルスが検出された。また従業員ふん便 98 件中 18 件 (18%)、吐物 10 件中 5 件 (50%) からノーウオークウイルスが検出された。原因食品ではカキ 3 件、イカの塩辛 1

件および中国産ウチムラサキ貝がノーウオークウイルスに汚染されており、ウチムラサキ貝の 1 件を除き、ウイルスコピー数は貝 (イカの塩辛 1g) 1 個当たりいずれも 200 個以上であった。

ふん便から検出されたノーウオークウイルスの遺伝子型では genogroup 1 (G1) が 7 件、genogroup2 (G2) が 65 件および G1+G2 は 11 件で、G2 が多く見られた。カキからは G1 が 3 件、G2 が 15 件で、ウチムラサキ貝では G1+G2 の両方が検出された。

検出されたノーウオークウイルス遺伝子解析では、患者からの G1 は 11 事例から 9 つの遺伝子型が認められ、遺伝子配列から Norwalk、Applachicola Bay、Valetta、Southampton、KU19eG1、KU80G1、KU4aG1 類似のものとそれ以外の 2 つの遺伝子型に分けられた。またカキからは Southampton、KU9eG1 と少し異なった一つの型、ウチムラサキ貝では Valett が検出されたが、いずれも少数であった。

G2 では 17 事例から Snowmantain、Richimondo、Honolulu、BD004359、New Orleans、Amsterdam、Arg320、Miami、Camberwel、Hawaii の 10 つの遺伝子型が、カキからは Richimondo、BD004359、Gwynedd、Amsterdam、Miami の 5 つの遺伝子型が見られたが、Gwynedd はカキのみで見出された。

## 6. 日本およびベトナムでの乳幼児におけるノーウオークウイルス感染と分子疫学的解析

日本の保育園では 12 月から 2 月に

44名中15名がノーウオークウイルスに感染し、31%に下痢症状が認められたが、69%は無症状であった。ノーウオークウイルスの排泄は1から56日で平均14日であった。ノーウオークウイルスの遺伝子型はCamberwell/Lordsdaleであった。

ベトナム乳幼児下痢症患者ふん便337件中21件(6%)がノーウオークウイルス陽性で遺伝子解析によりG2の2つの群と、1検体は中間型であった。1つの群はArg320とSwitzerland NLV AF402319に近縁であった。

#### 7. 地図情報システムによる食品汚染の危機管理シュミレーション

危機管理シュミレーションとして患者の地理的展開の地系列的解析によりノーウオークウイルス由来の食中毒事例は同一genotypeによる小児急性胃腸炎の散発発生と集団急性胃腸炎が地域内同時発生を呈し、無菌性髄膜炎患者は道路に沿って地域間流行が移動し、村では保育園、町では学校が主流であり、家族内感染を明示できた。この流行は4ヶ月に亘る長期間であった。

#### 8. 下痢性大腸菌の診断法の確立

局在性、凝集性及び拡散性付着性大腸菌の病原関連遺伝子13種類の検査を可能にした。従来法より簡便で迅速な生物活性測定法を検討した。患者対照比較研究を行い、疫学的に本菌群の下痢原性を調べた。日本の血清型には、国際的に対象となっている血清型がほとんどなく、分離数の多い01:H7と

018:H7は因子陰性で、血清型の見直しが必要と思われた。漬物を例として、集団食中毒の原因食品検査法を比較したところ、従来の方法では検出されなかったが、この方法で22%から検出された。

#### D. 考察

##### 1. 検査法の確立

本研究の遂行に際して、A型肝炎ウイルスのリアルタイムPCR法による検出法並びにサッポロウイルスのRT-PCR法におけるプライマーの設定とサッポロウイルスのリアルタイムPCR法を確立した。このことにより、食品並びに患者便等から上記2つのウイルスおよびノーウオークウイルスの検出のみならず定量も可能となり、食品等の汚染数が定量的に捉えられ、量的に評価が可能となった。実際に、ノーウオークウイルスは100個以下で、感染発病させると言われているが、食中毒事例でノーウオークウイルス陽性の原因食品は全て200コピー以上であったことから、原因食品中には発病させるウイルス汚染があったと考えられた。

RT-PCR陽性でリアルタイムPCR陰性のものも見られた。このことは貝類の中腸腺にリアルタイムPCR法の反応を阻害する物質が存在していると推察され、今後RNAの抽出法を改良し精度を高める必要がある。

現在用いているリアルタイムPCRおよびRT-PCR法のプライマーでは検出できない遺伝子型が明らかとなり、そ

れに必要なプライマー、プローブを設定したことから、ノーウオークウイルスの検出精度をより高くすることが可能となった。

## 2. 国産二枚貝におけるウイルス汚染実態調査

わが国の生カキでは25%からノーウオークウイルスが検出され、12月から1月にノーウオークウイルスに汚染されたカキが多く見られ、食中毒事例との関連性が示された。A型肝炎ウイルスは全て陰性であったことからわが国の海域では未だA型肝炎ウイルスに汚染されていないと推察された。

## 3. 環境中のウイルス汚染実態調査

河川水はノーウオークウイルスに汚染されている時が見られた。河川水の調査したところと異なっているが、海水の調査ではノーウオークウイルス陰性であったが、そこで養殖しているカキはノーウオークウイルス陽性のもも認められた。このことは20Lの海水で陰性であってもカキは1時間に海水を18L程度吸引することから、カキの中腸腺でウイルスが濃縮・蓄積され、ウイルス陽性となっていると推察される。従って来年度からは効率の良い海水濃縮法で行うと共に検査に適した量を明らかにしなければならないと考えている。またプランクトンからウイルスが検出されたことは海水中のウイルスがプランクトンと結合しているかあるいはプランクトンの体内に入っていることを示している。従って海水に変えてプランクトンで行えるのであれば

濃縮操作が不要で、検査がより簡便となるので、引き続き研究を継続し、海水汚染との関連性を追求する。

## 4. 輸入魚介類におけるウイルス汚染実態調査

ノーウオークウイルスは中国、韓国および北朝鮮からの輸入二枚貝の32件(13%)から、A型肝炎ウイルスは中国産の3件(1%)、サッポロウイルスは北朝鮮産のハマグリから検出された。また主に東南アジアからのエビ類では23件中2件(9%)からノーウオークウイルスが検出された。このことからこれら食品は十分に加熱しないと、感染する危険性が高いので衛生教育を広く行わなければならない。A型肝炎ウイルスは東南アジアで常在しているので、食品を介してわが国に入ってくる危険性が予測されていたが、現実のものとなった。来年度は中国産をある程度重点的に行うことにしている。

## 6. 食品媒介集団発生状況

ウイルス性食品媒介集団発生84事例の患者ふん便のウイルス学的検索で98%がノーウオークウイルスによるものであった。また従業員の18%からノーウオークウイルスが検出され、ヒト-ヒト感染が示唆される事例も見られ、小児の長期間観察で無症状でもノーウオークウイルスを長期間排泄しているものが認められており、成人でも同様なことが起きていると推察され、従業員の衛生教育が必要である。月別では12月から2月に、料理屋・飲食店での食事によるものが多く認められた。原因

食品不明が 43 件で半数を占めていたことから、原因食品を明らかにしないと、感染拡大防止あるいは感染経路遮断が困難で、不明食品の解明に努めなければならない。次いでカキの喫食 (37%) で、その他の二枚貝によっても起きている。今後カキを含めて二枚貝のウイルス学的な安全性の確保がウイルス性食中毒事例の発生防止に極めて重要である。

国産の二枚貝は A 型肝炎ウイルスに汚染されていないと考えられるが、今後も監視が必要である。

患者の吐物 10 件中 5 件からノーウオークウイルスが検出され、吐物 1g 中に 1,000 個から 10 万個のウイルスが存在し、吐物による感染拡大の危険性が推察される。本研究班の報告において、食品を介さない幼稚園、小、中、高等学校でノーウオークウイルスによる集団発生が見られ、その要因の一つとして吐物を介しての感染拡大が示唆され、吐物をウイルス学的に完全に不活化することが感染拡大防止に重要である。

患者およびカキから検出したノーウオークウイルスの遺伝子解析で、カキと患者で同一の遺伝子配列のものも認められ、食中毒の発生とカキ喫食との関連性が強く示唆された。

#### 6. 日本およびベトナムでの乳幼児におけるノーウオークウイルス感染と分子疫学的解析

食品汚染の主要な要因として乳幼児のノーウオークウイルスによる下痢症とふん便から大量にウイルスが排泄さ

れ、河川、海水を汚染し、それが二枚貝で蓄積され、それを食することにより食中毒が起こると推察されており、感染源として小児のウイルス動向が重要なポイントである。乳幼児から検出されたノーウオークウイルスの遺伝子型と食中毒事例の患者ふん便およびカキからのものと同一の遺伝子型が見出されており、環境汚染 (河川、海域) の要因の一つとして乳幼児からのウイルスとの関連性が明らかにされた。

#### 7. 地図情報システム (geographic information system, GIS) による食品汚染の危機管理シュミレーション

地図情報システム (geographic information system, GIS) による食品汚染の危機管理シュミレーションとして食中毒の分子疫学を行ったところ、ノーウオークウイルスでは同一 genotype による小児急性胃腸炎の散発発生と集団急性胃腸炎が地域内同時発生を呈し、両疾患の関連性が強く示唆された。年度を超えて同一遺伝子型が検出され、長期にわたり感染が発生する危険も示された。集団事例の多くはヒトからヒトの感染が考えられ、カキ食等の汚染食品のみならず調理師等の保菌者を介しての感染の危険性も示唆された。

#### 8. 下痢性大腸菌の診断法の確立

日本における付着性関連遺伝子陽性大腸菌の血清型は、国際的に対象となっている血清型がほとんど含まれてい

ない。統計的に、aggR 陽性の 0111 は有意差が見られ、下痢起因菌と思われた。eae 陽性株については全体では有意差は見られなかった。血清型間の比較にはさらに多くの調査数が必要である。また、分離数では1位と2位の01:H7と018:H7は、調べた因子は陰性であり、血清型の見直しが必要と思われた。

平成13年にキムチによる0157の全国的な流行が見られたこともあり、漬物を例として、集団食中毒の原因食品を調べる際の検査法を比較したところ、各種方法では22.2%から検出された。今回下痢原性大腸菌は検出されなかったが、汚染が起きる危険性があるので検査法を確立しておくことが重要である。

## E. 結論

わが国のウイルス性食中毒事例の発生はノーウオークウイルスに汚染している生カキ等の二枚貝によって40%程度が起きている。二枚貝におけるウイルス学的安全性が確保されれば、ウイルス性食中毒事例の半数近くを防止することができる。そのためには、ヒトのふん便あるいは吐物を介してのウイルス排泄並びに浄化槽からのウイルス流出、それに伴う河川、海水におけるウイルス動向、二枚貝におけるウイルスの濃縮・蓄積の生理的な解明、原因食品中のウイルス汚染量と発病との相関、微量なウイルス量の測定法の開発等における総合的な研究の遂行が必要である。さらにカキからウイルスを排

除するウイルス浄化法の開発も緊急課題の一つである。

A型肝炎ウイルスを含めウイルスおよび細菌が海外からの輸入魚介類を介してわが国に入り込み健康被害を起こしている。このことから、輸入魚介類の微生物学的安全性を確保するための検査体制を整備して監視することが望まれる。

追加：ノーウオークウイルスのウイルス診断の地方衛生研究所の支援として、主任の西尾 治はノーウオークウイルス検査法マニュアルの作成、診断用陽性コントロール、抽出時のインナーコントロールを全国の衛生研究所に配布し、検査精度の向上に寄与している。さらに本研究班の分担研究者、研究協力者の協力の下に、国立公衆衛生院の新興再興技術研修で小型球形ウイルスの診断法について地方衛生研究所ウイルス検査担当者に技術伝達を行っている。

## F. 健康危険情報

各食中毒発生事例は厚生労働省に食中毒事例として報告している。また、各自治体の広報等で食中毒発生に伴う、加熱の必要性、手洗いの励行、旅館・飲食店の従業員の教育等を行っている。

## G. 研究業績

### 1. 論文発表

西尾 治、加藤由美子：PCR産物のマ

イクロプレート・ハイブリダイゼーションによるノーウオークウイルスの確認および遺伝子型別試験について、日本臨床、印刷中、2002

藤本嗣人、近平雅嗣、増田邦義、吉田茂、箆ひとみ、今井恵介、三舛信一郎、長谷川斐子、西尾治：エンテロウイルス71型による脳炎死亡例を含む手足口病の流行—兵庫県、病原微生物検出情報22(6):144-145, 2001

Qiu-Hong Wang, Junko Kakizawa, Le-Ying Wen, Mitsugu Shimizu, Osamu Nishio, Zhaao-Yin Fang, and Hiroshi Ushijima. Genetic Analysis of the Capsid Region of Astroviruses. J. Med. Virology. 64: 245-255, 2001.

Osamu Nishio, Kiyohiko Matsui, Kee-tai Goh, Yasuko Matsunaga and Sakae Inouye. Prevalence of Adenovirus Type 3 and 7 Antibodies in Singapore. Jpn. J. Infect. Dis. 54:128-129, 2001.

新川奈緒美、伊東祐治、西尾治：ウチムラサキ貝が原因で夏季に発生したノーウオーク様ウイルスによる食中毒事例—鹿児島県—。病原微生物検出情報, 22:222-223, 2001。

KADOI, K., SUZUKI, H., and NISHIO, O.. Isolation of Cosackievir

us B5 from Pigs. Microbiologica 24:217-222, 2001

Kudo S, Ushijima H et al. Molecular characterization in the VP7, VP4 and NSP4 genes of human rotavirus serotype 4(G4) isolated in Japan. Microbiol. Immunol. 45: 167-171, 2001.

Wang QH, Nishio O, Ushijima H. et al. Genetic analysis of the capsid region of astrovirus. J. Med. Virol. 64:245-255, 2001.

Zhou Y, Ushijima H et al. Characterization of human rotavirus serotype G9 isolated in Japan and Thailand from 1995 to 1997. J Med Virol 65:619-628, 2001.

Jonassen CM, Ushijima H, Grinde B et al. Comparison of capsid sequences from human and animal astroviruses. J Gen Virol 82:1061-1067, 2001.

Adah M. I, Wade A, Oseto M, Kuzuya M and Taniguchi K. Detection of Human Group C Rotaviruses in Nigeria and Sequence Analysis of Their Genes Encoding VP4, VP6, VP7 Proteins. J. Med. Virol. 2002; 66: 269-275

勢戸、春木他、事業所給食によるノー



ウォーク様ウイルス食中毒事例-大阪市、病原微生物検出情報、2002

Ono K., Rai SK., Chikahira M., Fuzimoto.T, Shibata H. et al. : Seasonal distribution of enteropathogens detected from diarrheal stool and water samples collected in Kathmandu, Nepal, Southeast Asian J Trop Med Public Health, 2001,32(3): 520-526.

藤本 嗣人、近平 雅嗣、増田邦義、長谷川 斐子、西尾 治：兵庫県における過去8年間（1993～2000年）のエンテロウイルス検出・同定状況、兵庫衛研年報、2001、36：75-81.

Iritani N., Seto Y., Haruki K. et al. : Prevalence of “Norwalk-Like Virus” Infections in Outbreaks of Acute Nonbacterial Gastroenteritis Observed During the 1999-2000 Season in Osaka City, Japan. J. Med. Virol. 2002;66:131-138

## 2. 学会発表

坂井 胤、鈴木 宏：GISの感染症疫学調査への応用、第1回新潟小児感染症研究会、2001.

新川奈緒美、永田告治、松野重夫、西尾 治：鹿児島県における胃腸炎集団発生事例および自生カキから検出された Norwalk virus の疫学的検討、

第42回日本臨床ウイルス学会、2001、6、6-7、P70、名古屋

李 蕾、清水英明、周玉梅、西尾 治、杉田久美子、上田勇一、西村修一、金保珠、西村忠史、黒岩利正、中谷茂和、牛島廣治：分子疫学的方法による小児下痢症アデノウイルスの検討、第42回日本臨床ウイルス学会、2001、6、6-7、P73、名古屋

川本 歩、加藤由美子、西尾 治：ヒトと環境水およびカキから検出した Norwalk virus の遺伝子解析、第49回日本ウイルス学会総会、2001、11、18-29、P. 83 大阪

西尾 治、加藤由美子、秋山美穂、辰巳正純、本間真二郎、中田修二、磯村思无：パキスタンの乳幼児からのノーウォークウイルスおよびSV検出状況、第49回日本ウイルス学会総会、2001、11、18-29、P. 88、大阪

李 蕾、清水英明、西尾 治、沖津祥子、牛島廣治：1999年—2000年日本での小児下痢症におけるアデノウイルスの検討、第49回日本ウイルス学会総会、2001、11、18-29、P. 90、大阪

Grant Hansman, Doan Lan, Shoko Okitu, Osamu Nishio, Yumiko Kato, Hiroshi Ushijima, Sporadic cases of Norwalk-like virus infection : ノーウォークウイルス vietnam reveal two

distinct cluster in Genogroup II、  
第 49 回日本ウイルス学会総会、  
2001, 11, 18-29、P. 89, 大阪

藤本嗣人、近平雅嗣、吉田 茂、長  
谷川斐子、近藤香邦子、西尾 治：エ  
ンテロウイルス 71 型による脳炎死亡  
例を含む手足口病の流行、第 49 回日本  
ウイルス学会総会、2001, 11, 18-29、  
P. 208, 大阪

Doan Thi Phuong Shoko Okitsu,  
Osamu Nishio, Hiroshi Ushijima, :  
Distribution of rotavirus G serotype  
among hospitalized children of Ho  
Chiminh city, Vietnam, 第 49 回日本  
ウイルス学会総会、2001, 11, 18-29、  
P. 213, 大阪

大瀬戸光明、山下育孝、吉田紀美、近  
藤玲子、岡田峰幸、篠崎邦子：急性胃腸  
炎の集団発生例及び散発例における  
Sapporo virus の役割。第 49 回日本ウイ  
ルス学会、2001,11,大阪

左近直美、大瀬戸光明、山崎謙治、大石  
功、奥野良信：Human astrovirus  
(HastV)のエピトープ解析。第 49 回日本  
ウイルス学会、2001,11、大阪

杉枝正明、中島節子：ブタから検出し  
た Norwalk-like virus 遺伝子の ORF1  
3'末端及び ORF2 の塩基配列の解析、第  
49 回日本ウイルス学会、2001,11、大阪

入谷、春木他：Real time PCR を用いた  
Norwalk virus の検出、近畿地区ウイル  
ス疾患協議会研究会、2002, 2、京都

## **II**

**厚生科学研究費補助金**

**(生活安全総合研究事業)**

**食品中の微生物汚染状況の把握と安全性の評価に関する研究**

**平成 13 年度 分担研究報告書**

平成 13 年度厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書

食品中の微生物汚染状況の把握と安全性の評価に関する研究

分担研究項目 リアルタイム PCR 法による A 型肝炎ウイルス検出法の開発

主任研究者 西尾 治 国立公衆衛生院

協力研究者 秋山 美穂 国立公衆衛生院

加藤 由美子 国立公衆衛生院

研究要旨

A 型肝炎ウイルスの検出法としてリアルタイム PCR 法のプライマー、プローブを設定し、A 型肝炎患者便を用い、RT-PCR と比較したところ、今回開発したリアルタイム PCR 法は検出感度も高く、短時間で結果が得られる等優れた検査法であることが明らかとなった。

A. 研究目的

A 型肝炎ウイルスの検出には ELISA 法あるいは RT-PCR 法が行われている。しかしリアルタイム PCR 法による A 型肝炎ウイルスの検出法は未だ開発されていないようである。そこで食品並びに患者便から HAV の定量を行えるようにすることを目的として、リアルタイム PCR 法を開発することを目的とした。

B. 研究材料および方法

ふん便材料は HAV 患者からの 25 件および非肝炎患者便 3 件を用い、便材料は 10% 乳剤としたのち、10,000 回転 20 分間遠心した上清を用いた。

ふん便からの RNA 抽出は QIAamp Viral RNA Mini Kit で行ない、DNase 処理したのち、ランダムヘキサマーを用い、スーパースクリプト II で cDNA を作製した。

この cDNA を用いて、リアルタイム

PCR 法と RT-PCR 法を実施した。

リアルタイム PCR は ABI7700 を用いて、PCR 反応進行中に蛍光強度を測定し、標的領域をクローニングしたプラスミド DNA を  $10^7$  から  $10^0$  コピーに希釈した標準サンプルによる検量線を作成し、サンプルの初期濃度を算出した。

RT-PCR 法では A、B 二組のプライマーセットを用いた。セット A は 5' 非翻訳領域で設定し、1st PCR は HAV+257/HAV-707、Nested PCR は HAV+449/HAV-557（このプライマーはリアルタイム PCR と同一のもの）で、セット B は VP1/2A をコードする領域で、1st PCR は HAV+2795/HAV-3351、Nested PCR は HAV+2903/HAV-3296 で行った（図 1）。

リアルタイム PCR 法はプライマーセット A の Nested PCR と同様のプライマー（HAV+449/HAV-557）を用い、プローブは 5' 側に TET、3' 側に TAMRA をラベル