

した TaqMan プローブ HAV+482-P-TET を用いた。(図 2)。試薬の調整、PCR 反応条件は図 2 に示した方法でおこなった。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 10 倍階段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(コピー数)を算出した。

1. 反応液の調製

DDW	11.22 μ l
TaqMan Universal Master MIX (ABI)	17.50 μ l
100pmol/ μ l プライマー-HAV+449	0.14 μ l
100pmol/ μ l プライマー-HAV-557	0.14 μ l
4pmol/ μ l プローブ HAV+482-P-TET	2.00 μ l
cDNA	4.00 μ l

↓

2. PCR 反応条件

50°C 2 分間
 95°C 10 分間
 95°C 15 秒間
 56°C 2 分間

} 50 回

図 2. リアルタイム PCR 法

C. 研究成績

1) リアルタイム PCR 法と RT-PCR による検出コピー数

リアルタイム PCR 法の標準サンプル 10^7 から 10^0 コピーをプライマーセット A で RT-PCR 法を行ったところ、First PCR では 10^3 コピー以上、Nested PCR では 10^1 コピー以上で電気泳動でバンドを確認することができ、リアルタイム PCR 法の検出感度は 1st PCR 法よりも 100 倍程度高く、Nested PCR とほぼ同程度であった。

2) リアルタイム PCR 法と RT-PCR 法の A セットプライマー-First PCR との比較

リアルタイム PCR では 18 件が陽性であったが、RT-PCR 法では半数の 9 件に検出バンドが見られたにすぎなかった(表 1)。リアルタイム PCR で 10 コピー以下の土としたものは RT-PCR で陰性であった。

表 1. リアルタイム PCR 法と A セットプライマー-First PCR との比較

リアルタイム \ RT-PCR	+	-	計
+	9	9	18
±	0	1	1
-	0	9	9
計	9	19	28

プライマー：HAV+2795/3351

3)リアルタイム PCR 法と A セットプライマー-Nested PCR との比較

リアルタイム PCR 陽性で Nested PCR 陽性は 15 件、リアルタイム陽性で Nested PCR 陰性は 3 件であった(表 2)。リアルタイム PCR ± のものは Nested PCR 陰性であった。

なお、1 件はリアルタイム PCR 陰性であったが、Nested PCR 陽性であった。

表 2. リアルタイム PCR 法と A セットプライマー-Nested PCR との比較

リアルタイム \ RT-PCR	+	-	計
+	15	3	18
±	0	1	1
-	1	8	9
計	16	12	28

プライマー：HAV2903/3296

4) リアルタイム PCR 法と B セットプライマー-First PCR との比較

リアルタイム PCR 法で用いたプライマー-B セットを用いて検討した。

リアルタイム PCR と First PCR の比較では先のプライマーの成績と比較するとほぼ Nested PCR と同様な成績であ

った(表 3)。

表 3. リアルタイム PCR 法と B セットプライマー-First PCR との比較

リアルタイム \ RT-PCR	+	-	計
+	13	5	18
±	0	1	1
-	1	8	9
計	14	14	28

プライマー：HAV+2571-707

5) リアルタイム PCR 法と B セットプライマー-Nested PCR 法との比較

リアルタイム PCR と Nested PCR では 18 件が共に陽性であった。またリアルタイム PCR で陰性の 4 件は Nested PCR 陽性で、このプライマーセットでは Nested PCR の法が検出の感度が少し上回った。

表 4. リアルタイム PCR 法と B セットプライマー Nested PCR との比較

リアルタイム \ RT-PCR	+	-	計
+	18	0	18
±	0	1	1
-	4	5	9
計	22	6	28

プライマー：HAV+449/-557

D. 考察

今回、設定したリアルタイム PCR 法の検出感度は First PCR 法よりも 100 倍程度高感度であり、ほぼ Nested PCR と同感度であった。このことから、今回

設定したリアルタイム PCR 法はふん便ならびに食品からの A 型肝炎ウイルスの検出に用いることが出来ると考えられた。

また、このリアルタイム PCR 法は Nested まで行う必要が無く、ウイルスのコピー数の定量が行え、PCR と同時にハイブリダイゼーションを行っており、PCR 産物の電気泳動の必要も無く、フタを開けなくて良い。以上のことから、短時間で、確認試験も行え、コンタミネーションの危険性も少なく優れた検査法であると思慮される。

E. 結論

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。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

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 法によるサッポロウイルス検出法の開発
に関する研究

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
分担研究者	大瀬戸 光明	愛媛県立衛生環境研究所
	杉枝 正明	静岡県環境衛生研究所
	古屋 由美子	神奈川県衛生研究所

研究要旨

サッポロ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、下痢症患者便を用い、RT-PCR と比較したところ、今回開発したリアルタイム PCR 法は検出感度の高く、サッポロウイルスに属する遺伝子型の殆どの検出が行え、結果が短時間で得られる等優れた検査法であることが明らかとなった。しかし、RT-PCR 法で陽性でも、リアルタイム PCR 法で検出されないものが見られたので、さらに検討する必要がある。

A. 研究目的

サッポロウイルスの検出には RT-PCR 法が行われている。ノーウークウイルスのリアルタイム PCR 法は示されているが、サッポロ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

ふん便材料は下痢症患者からのふん便 21 件を用い、ふん便材料は 10% 乳剤としたのち、10,000 回転 20 分間遠心した上清

を検査材料とした。

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。

なお、サッポロウイルスは大きく遺伝子型が Sapporo、Manchester、Parkvill の 3 つに分かれており、今回 Gene Bank の遺伝子配列を調べたところ、一組のプライマーではこれら全てを検出することは困難であるので、リアルタイム PCR では 2 組を設定して行った（図 1）。

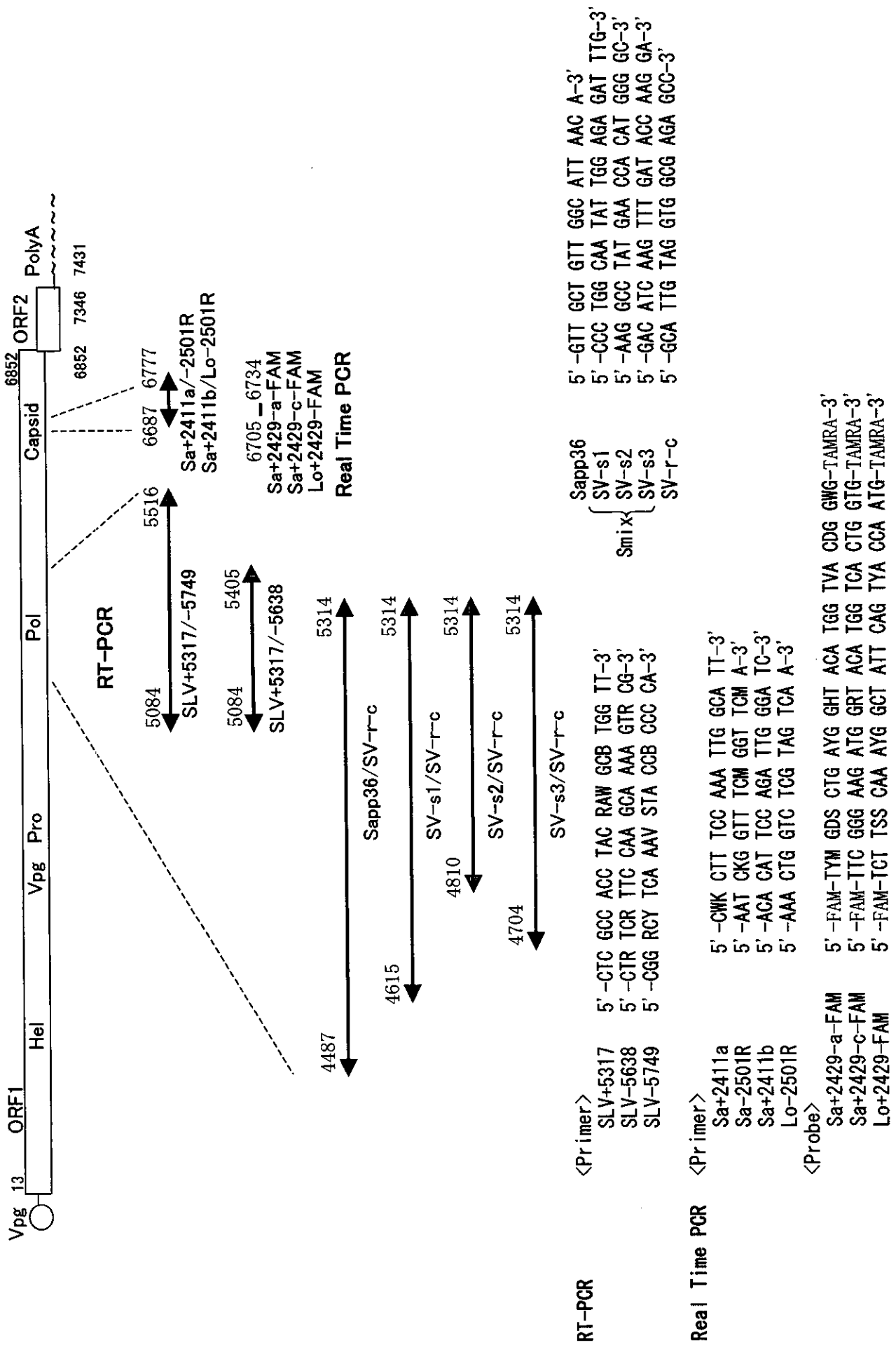


図1. Sapporo-like viruses検出のRT-PCR法とReal Time PCR法におけるプライマーとプローブの位置

RT-PCR は Honnma らの N36、*r-c-1/Smix*、およびわれわれが設定した SLV+5314、SLV-5638、SLV-5749 を用いて行った。

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 から 10 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。

1) 反応液の調製

反応液の調製は図 2 のように行った。

図 2. 反応液の調整

(1) Sapporo

DDW	10.72 μ l
TaqMan Universal Master MIX (ABI)	17.50 μ l
100pmol/ μ l プライマー Sa+2411a	0.14 μ l
100pmol/ μ l プライマー Sa-2501R	0.14 μ l
4pmol/ μ l プローブ Sa+2429-a-FAM	1.50 μ l
4pmol/ μ l プローブ Sa+2429-c-FAM	1.00 μ l
cDNA	4.00 μ l

(2) London

DDW	12.22 μ l
TaqMan Universal Master MIX (ABI)	17.50 μ l
100pmol/ μ l プライマー Sa+2411b	0.14 μ l
100pmol/ μ l プライマー Lo-2501R	0.14 μ l
4pmol/ μ l プローブ Lo+2429-FAM	2.00 μ l
cDNA	4.00 μ l

2) PCR 反応

PCR 反応は以下の様に行った。

50°C 2 分間
 95°C 10 分間
 95°C 15 秒間
 53°C 2 分間

50 回

C. 研究成績

1) リアルタイム PCR 法と RT-PCR

Sapporo ウイルス用の陽性コントロールとして増幅部分を大腸組に組み込んだ DNA を 10^{-7} から 10^{-0} まで 10 倍階段希釈したものを用いて Sapporo ウイルスのリアルタイム PCR と RT-PCR 法を同一のプライマーを用いて比較したところ、リアルタイム PCR では 10^{-1} から、RT-PCR 法では 10^{-4} から検出された。

London ではリアルタイム PCR 法の検出感度は Sapporo と同様であったが、RT-PCR では 10^{-3} から検出された

2) リアルタイム PCR 法と RT-PCR 法との比較

PCR の *r-c-1/Smix* では 18 件中 12 件が陽性で、SLV+5317/-5749 の 1st PCR では 5 件が、SLV+5317/-5638 の 2nd PCR では 9 件が陽性であった。また、リアルタイム PCR のサッポロでは 2 件が陽性で、コピー数は 10445、21825 で、London では 9 件が陽性で、サッポロとロンドンを合わせると 11 件からコピー数 32 から 13651360 で検出された。

しかし、RT-PCR で陽性であった 4 件はリアルタイム PCR で検出されなかった。

表1 サッポロウイルスの陽性検体検査結果

検体名	RT-PCR	Seq	RT-PCR		Real timePCR	
	2nd		1st	2nd	Sapporo (コピー/g)	London (コピー/g)
	r-c-1 /Smix		SLV+5317 /-5749	SLV+5317 /-5638		
E2000-831	-		+	+	-	-
E2000-1785	+	London	+	-	-	2.9×10^7
E2K-643	-		-	+	-	-
E2K-822	-		+	+	-	-
E2K-831	-		-	+	-	-
E2K-927	-	Manchester	-	+	2.7×10^7	-
E2K-1030	-	Manchester	-	-	8.0×10^3	-
E2K-1785	+	London	-	-	-	9.4×10^8
E2K-1948	-	London	-	-	-	5.4×10^3
E99-1107	-		-	-	-	-
E99-1596	-		-	-	-	-
P990/95	+	London	-	+	-	6.7×10^8
P14/96	+	London	-	-	-	1.6×10^4
P54/96	+	Sapporo	+	+	5.9×10^7	-
P151/98	+	London	-	-	-	8.6×10^4
P44/97	+	London	-	+	-	1.2×10^6
P63/97	+	London	-	+	-	6.4×10^6
P64/97	+	London	-	+	-	1.1×10^6
P81/97	+	London	+	-	-	3.7×10^{10}
P175/98	+	London	+	-	-	6.2×10^8
P122/99	+	London	ND	ND	-	2.7×10^2

D. 研究考察およびまとめ

今回設定したリアルタイム PCR 法では検出感度は RT-PCR 法よりも数段優れており、さらにウイルスの定量も可能であった。Sapporo、London および

Manchester 型が検出され、ほぼ目的を達していると考えられた。それらの遺伝子型に属するもので、RT-PCR 法で検出され、リアルタイム PCR 法で陰性のものも少数に見られた。従って、今後 RT-PCR 陽性で、リアルタイム PCR 陰性のものについてその原因を明らかにし、さらに検出

精度の向上に努めなければならないと考えている。

平成 13 年度厚生科学研究補助金（生活安全総合研究）

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 海水の濃縮法に関する研究

主任研究者 西尾 治 国立公衆衛生院

研究協力者 秋山 美穂 国立公衆衛生院

研究要旨

陰電荷膜と陽電荷膜による海水からのウイルス濃縮について検討した。人工海水にポリオウイルス 2 型を添加し、ウイルス濃縮効率を検討したところ、陰電荷膜の方が約 6 倍近く優れていた。今年度は陽電荷膜法で行ったが、来年度から海水、河川水の濃縮は陰電荷膜による濃縮法で行うことにする。

A. 研究目的

海水中のウイルス検出には海水中のウイルス量が極めて少ないことから、海水を効率よく濃縮しなければならない。海水の濃縮法として従来は陽電荷膜法で行われているが、海水中には陽電荷イオンが多く存在するので、陰電荷膜の方が回収率が良いという報告が最近された。そこで、人工海水を用いて、陰電荷膜と陽電荷膜の回収率について検討した。

B. 研究方法

海水の代わりに人工海水 10 L にポリオウイルス 2 型 (Sabin 株) 1.0 ml を加え、陽電荷膜法と陰電荷膜法による濃縮を行った。

陰電荷膜法は (図 1) に示した方法で行った。

1) 陰電荷膜法

孔径 $5\mu\text{m}$ の膜の下に孔径 $0.45\mu\text{m}$ の膜を重ねて濾過機に装着し、海水を 10 L (900 ml/min の流速で) 通した。次いで、 $1.0 \times 10^{-3} \text{ N H}_2\text{SO}_4$ (pH3) 1.8 L (900 ml/min の流速で) を膜に通し、あらかじめ $0.1 \text{ M H}_2\text{SO}_4$ 225 μl と 100 倍 TE バッファー 450 μl を入れた 50 ml 遠心管を排水口に装着し、 $1.0 \times 10^{-3} \text{ N NaOH}$ (pH10.5) 45 ml を膜に注ぎ、5 分間置いた後、濾液をゆっくり (10 ml/min の流速) 回した。

遠心式フィルターユニット (MILIPORE、Centriprep Concentrator 50) を用いて、2500 rpm、 4°C 、10 分間遠心分離後に膜を透過した液層を捨て、管壁に残った液層を回収する。4 回行ない最終 1.5 ml 程度にした。これをウイルス力価測定に用いた。

2) 陽電荷膜法

加圧濾過器に陽電荷フィルターをセットし、海水 10L を 1N-HCl で pH5~6 に調整し、加圧ポンプを用い、フィルターに海水を通した。次いでフィルターを加圧濾過器から外し滅菌容器(シャーレ 径 150×25mm)に入れ、フィルターに(3%Beef extract, 1%NaCl, 15%NaNO₃, pH9) を 15~20ml 注ぎ、4°Cに 1 時間置いた後、フィルター表面を Cell scraper でかき取り、かき取った溶液を 50ml 滅菌チューブに入れ、クロロフォルムを等量加え、ボルテックスし、2,500rpm、30 分間遠心分離し夾雑物を除き、上清を遠心式フィルターユニット (MILIPORE、Centriprep Concentrator 50)を用いて、2500rpm、4°C、10 分間遠心分離後に膜を透過した液層を捨て、管壁に残った液層を回収した。4 回行ない最終 1.5ml 程度にした。これをウイルス力価測定に用いた。

3) ウイルス力価測定

ウイルス力価測定は 96 ホールのマイクロプレートに MA104 細胞を培養したものに、添加ウイルス液、海水の濃縮前、濃縮後のものを MEM で 10 倍階段希釈したものを細胞の 4 ホールに 0.025ml 接種し、6 日間観察して、細胞変性効果が認められた最大希釈倍数の逆数をウイルス力価とした。

C. 研究結果

海水に添加したウイルス力価は $10^4/0.025\text{ml}$ で、海水に添加した時(濃縮前)は $10^{0.25}/0.025\text{ml}$ であった。陰電荷膜では $10^3/0.025\text{ml}$ 、陽電荷膜では

$10^{2.25}/\text{ml}$ で陰電荷膜では 600 倍近くまで程度に濃縮されたのに対し、陽電荷膜では 100 倍程度で、陰電荷膜法が優れていた。

D. 考察

海水中のウイルス量は極めて少量である。海水からのウイルス検出には大量の海水から効率よく濃縮しなければならない。極最近になり、海水からのウイルス濃縮法として、陰電荷膜法が報告されたので陰電荷膜と従来の陽電荷膜による海水の濃縮について検討したところ、陰電荷膜の方が約 6 倍程度優れていた。この原理は海水には陽イオンが多く、ウイルスは陽電荷膜に吸着する前に、海水中の陽イオンと結合し、中性では陽イオンによって負に帯電したウイルスが陰電荷膜に吸着する。酸による洗浄工程により、陽イオンは湧出され、ウイルスは酸性では正に帯電しており、陰電荷膜に吸着する。アルカリ誘出によりウイルスは再び負に帯電し、陰電荷膜から誘出されるものである。

今年度は陽電荷膜法で行ったが、来年度から海水、河川水の濃縮は陰電荷膜による濃縮法で行うことにする。

E. 結論

海水からのウイルス濃縮には陰電荷膜法が約 10 倍程度優れていた。今後この方法で、海水からのウイルス検出を行うことにする。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

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

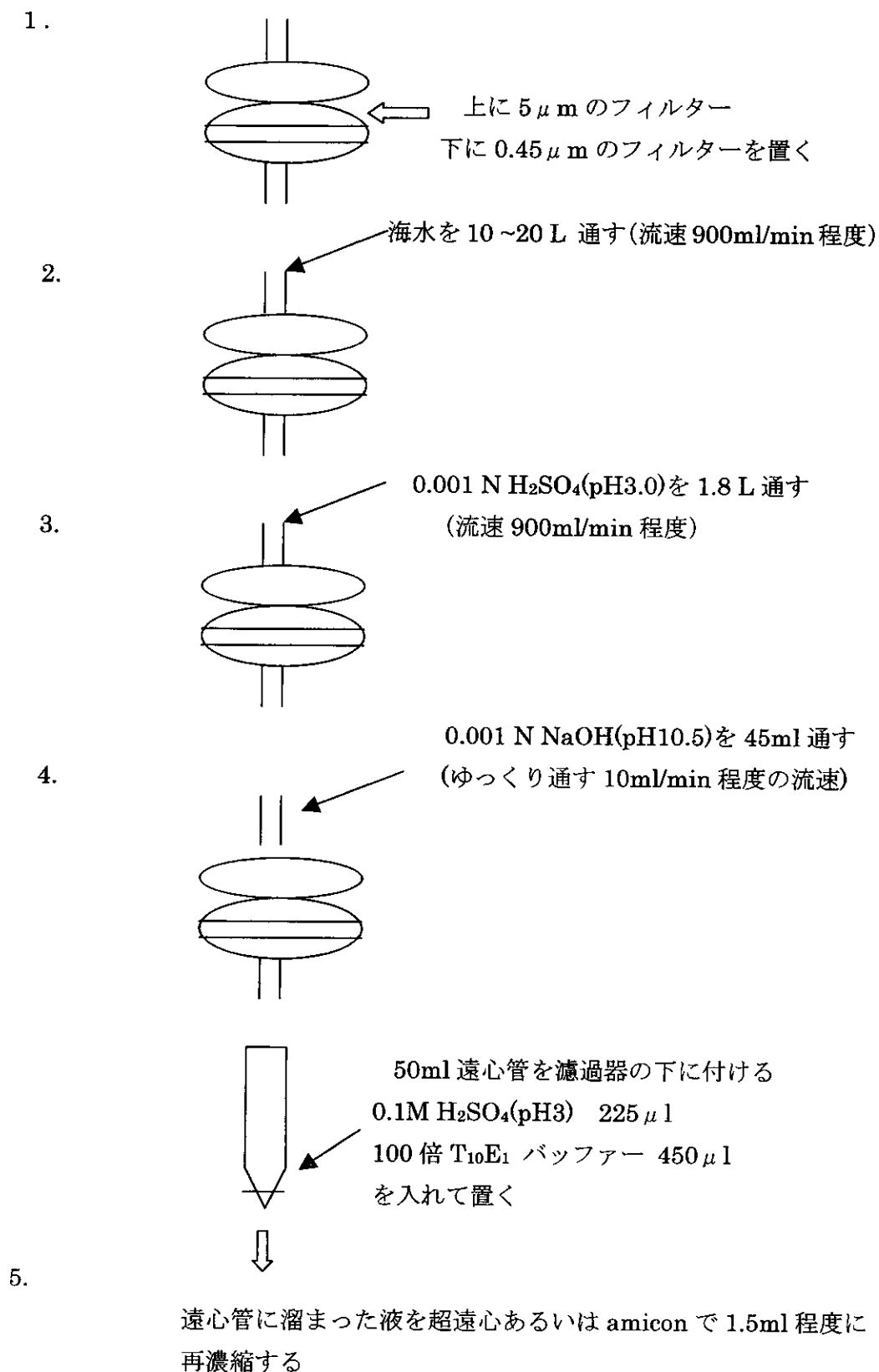


図1. 陰電荷膜を用いた海水からのウイルス濃縮法

平成 13 年度厚生科学研究補助金（生活安全総合研究）

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 輸入食品のウイルス汚染状況に関する研究

主任研究者 西尾 治 国立公衆衛生院
研究者協力者 田中俊充 千葉県食品検査所

研究要旨

中国、韓国並びに北朝鮮から輸入された二枚貝 81 件について、ノーウォークウイルス、A 型肝炎ウイルスおよびサッポロウイルスの汚染状況を調べたところ、12 件からノーウォークウイルスが検出され、12 月および 1 月に多い傾向が認められた。A 型肝炎ウイルスは中国産ハマグリから 2 件、ウチムラサキ貝 1 件から検出された。従って、今後も国民の健康保持のために輸入魚介類のウイルス学的安全性に関して規模を拡大して監視していく必要がある。

A. 研究目的

魚介類による生鮮食品を介する A 型肝炎や急性胃腸炎の食中毒事例が報告されている。わが国は大量の食品輸入国であり、生鮮魚介類は毎年 33 万トン以上が輸入されている。しかし、食品のウイルス学的安全性の評価は最近までほとんどなされていない。そのため本研究は、統一したウイルス検査方法を用いて、輸入食品のウイルス汚染状況の実態を把握し、健康被害対策に資することを目的とした。

B. 研究材料と方法

検査材料は愛知県北部市場に平成 13 年 4 月から 1 月の間に搬入されたものを用いた。

中国産ハマグリ 28 件、アサリ 17 件、ウチムラサキガイ 2 件、韓国産アカガイ 19

件、タイラガイ 4 件、アサリ 1 件、北朝鮮産ハマグリ 2 件、アサリ 8 件、計 81 件だった。

検査材料は中腸腺を摘出し、PBS で 20% 乳剤とした後、ホモジナイズし、10,000rpm. 20 分間遠心し、その上清を、35,000rpm. で 3 時間遠心し、その沈渣に MEM を 500 μ l 入れ、その 140 μ l を RNA 抽出に用いた。RNA 抽出は QIAamp Viral RNA Mini Kit で行った後、DNase 処理後、random hexamer を用い、Super Script II RT で cDNA を作製し、それをリアルタイム PCR に用いた。

A 型肝炎ウイルス検出は西尾らが設定した (A 型肝炎ウイルスの検出法に関する研究の項参照) プライマー HAV+449: 5' -ATG GTA ACA GCG GCG GAT A T-3' と HAV-557: 5' -ACA GCC CTG ACA GTC AAT YCA CT-3' を、プローブ は HAV+482-P

-TET : 5' - AGA CAA AAA CCA TTC AAC RCC
GRA GGA C-3' 用いて行った。

ノーウオークウイルスのリアルタイム
PCR は景山らの方法に準じて行った。

genotype I ではプライマーCOG1F:5' -
CGY TGG ATG CGN TTY CAT GA-3' と
COG1R:5' -CTT AGA CGC CAT CAT CAT TYA

C-3'、プローブはRING1 - TP(a):5' -
AGA TYG CGA TCY CCT GTC CA-3' と

RING1 - TP(b):5' -AGA TCG CGG TCT CCT
GTC CA-3' の2つを用いた。genotype II

ではプライマーCOG2F:5' -CAR GAR BCN
ATG TTY AGR TGG ATG AG-3' と

COG2R:5' TCG ACG CCA TCT T CA TTC
ACA-3'、プローブはRING2 - TP:5' TGG

GAG GGC GAT CGC AAT CT-3' を用いた。

サッポロウイルスのリアルタイム PCR 法
は西尾らが設定した (Sapporo ウイルス

の検出法に関する研究参照) サッポロ型
を検出用はプライマー Sa + 2411a :

5' -CWK CTT TCC AAA TTG GCA TT-3' と
Sa-2501R:5' -AAT CKG GTT TCM GGT TCM

A-3' を、プローブ Sa+2429a-FAM:5' -
TYM GDS CTG AYG GHT ACA TGG TVA CDG

GWG-3' と Sa+2429c-FAM: 5' -TTC GGG
AAG ATG GRT ACA TGG TCA CTG GTG-3' の

2つを用いた。ロンドン型を検出にはプ
ライマーSa+2411b:5' -ACA CAT TCC AGA

TTG GGA TC-3' と Lo-2501R:5' -AAA CTG
GTC TCG TAG TCA A-3' をプローブは

Lo+2429-FAM:5' -TCT TSS CAA AYG GCT
ATT CAG TYA CCA ATG-3' で行った。

ノーウオークウイルスおよびA型肝炎ウ
イルスのPCR反応は50℃ 2分、95℃ 10

分を1サイクルした後、95℃ 15秒、56℃

3分を50回行った。サッポロウイルスの
PCR反応は50℃ 2分、95℃ 10分を1
サイクルした後、95℃ 15秒、53℃ 3
分を50回行った。判定は蛍光強度でコン
トロールのDNAコピー数の検量線から
ウイルスのDNA量を算出した。

C. 研究成績

1) 食品の月別検出状況

4月から11月の間では5月に採取した
中国産のハマグリからノーウオークウイ
ルスが1件、5月と7月の中国産ハマグ
リからA型肝炎ウイルスが検出された
(リアルタイムPCR法陰性、RT-PCR法陽
性であった)。

12月と1月では中国産アサリからノー
ウオークウイルスのG1が2件(リアルタ
イムPCR法陰性、RT-PCR法陽性であっ
た)、G2が2件(リアルタイムPCR法陰性、
RT-PCR法陽性であった)、G1とG2の両方
が検出がされたもの1件(199と235
コピー/中腸腺1g)、中国産ハマグリから
ノーウオークウイルスのG2が5件(57
コピー、162コピー、3件はリアルタイム
PCR法陰性、RT-PCR法陽性であった)と
北朝鮮産ハマグリからG1(84コピー)が、
ウチムラサキ貝からA型肝炎ウイルスが
検出された(リアルタイムPCR法陰性、
RT-PCR法陽性であった)。サッポロウイ
ルスは検出されなかった。

表1 輸入食品月別汚染状況

月	国名	種類	検体数	検出ウイルス (ウイルスコピー数/中腸腺 1g)			
				NV		HAV	Sa
				G1	G2		
4月	中国	ハマグリ	2	0	0	0	0
	韓国	アカガイ	2	0	0	0	0
		タイラガイ	1	0	0	0	0
5月	中国	ハマグリ	2	0	57	0 [1]	0
	韓国	アカガイ	2	0	0	0	0
		タイラガイ	1	0	0	0	0
6月	中国	ハマグリ	2	0	0	0	0
	韓国	アカガイ	2	0	0	0	0
		タイラガイ	1	0	0	0	0
7月	中国	ハマグリ	3	0	0	0 [1]	0
	韓国	アカガイ	2	0	0	0	0
8月	韓国	アカガイ	4	0	0	0	0
		アサリ	1	0	0	0	0
9月	中国	ハマグリ	2	0	0	0	0
	韓国	アカガイ	2	0	0	0	0
		タイラガイ	1	0	0	0	0
10月	中国	ハマグリ	3	0	0	0	0
	韓国	アカガイ	5	0	0	0	0
11月	中国	ハマグリ	2	0	0	0	0
12月	中国	アサリ	10	199* [2]	235* [3]	0	0
		ウチムラサキガイ	2	0	0	0 [1]	0
	北朝鮮	アサリ	3	0	0	0	0
1月	中国	ハマグリ	12	0	162 [3]	0	0
		アサリ	7	0 [1]	0	0	0
	北朝鮮	ハマグリ	2	84	0	0	0
		アサリ	5	0	0	0	0
計			81	2 [3]	3 [6]	0 [3]	0

* : 同一検体から検出された

[] 内は RT-PCR 陽性件数

2) 国別の検出状況

中国産では47件中10件からノーウオークウイルスが検出され、ハマグリ 28件中5件からG2が、アサリ 17件中2件からG1が、2件からG2が、1件から

G1+G2が検出され、A型肝炎ウイルスはアサリから2件、ウチムラサキ貝から1件検出された。韓国産は全て陰性であったが、北朝鮮産10件中1件(ノーウオークウイルス、G1)が陽性であった。

表2 輸入食品国別汚染状況

国名	種類	検体数	検出ウイルス (ウイルスコピー数/中腸腺 1g)			
			NV		HAV	Sa
			G1	G2		
中国	ハマグリ	28	0	57 162 [3]	0	0
	アサリ	17	199* [3]	235* [3]	0 [2]	0
	ウチムラサキガイ	2	0	0	0 [1]	0
韓国	アカガイ	19	0	0	0	0
	タイラガイ	4	0	0	0	0
	アサリ	1	0	0	0	0
北朝鮮	ハマグリ	2	84	0	0	0
	アサリ	8	0	0	0	0
計		81	2 [3]	3 [6]	0 [3]	0

* : 同一検体から検出された

[] 内は RT-PCR 陽性件数

D. 研究考察

今回の輸入食品のウイルス汚染状況は低いものであった。わが国の生カキのノーウオークウイルス汚染は主に1月から多くなる。また、わが国の平成13年度の病因物質別では小型球形ウイルスによる患者数が第1位で最も多く、その中には輸入魚介類によるものも含まれている(分担研究者新川奈緒美先生の報告の中

にもウチムラサキ貝を介するノーウオークウイルスの集団発生)、さらに、中国産のうちムラサキ貝はノーウオークウイルスとA型肝炎ウイルスの両方に汚染されていた。ノーウオークウイルスは12月、1月に採取したものに、やや陽性が多い傾向が見られ、わが国の生カキでもこの時期にノーウオークウイルスに汚染されたものが多くなっていることと同様な成

績であった。今後は12月から3月の間はさらに輸入食品のノーウオークウイルス汚染について詳細に検討すべきであると考えている。

今回の研究ではA型肝炎ウイルスは中国産輸入食品3件から検出された。

平成13年度の厚生労働省感染症発生病動向調査によると、急性ウイルス性肝炎患者の報告数は903名で、A型肝炎ウイルスは481名、B型肝炎ウイルスは323名、C型肝炎ウイルスは56名、その他の急性ウイルス肝炎29名、型不明が14名で、わが国ではA型肝炎ウイルスは血清学的調査から常在していないと考えられているにも拘わらず急性肝炎の半数以上を占めており、その要因の一つとして食品によるものが相当数含まれていると推察された。しかし、A型肝炎ウイルスは潜伏期が2週から8週で、平均で1ヶ月ほどであり、たとえ食品であってもその原因食品の特定には困難なことが多く、殆どが原因不明となっている。今後、食品からのA型肝炎ウイルスの汚染の監視を継続すると共に、A型肝炎患者で海外渡航歴あるいは同性愛者の要因が無いものについては、食品との関連性を詳細に調査する必要があるものと考えている。

E. 結論

輸入二枚貝におけるノーウオークウイルス、A型肝炎ウイルスおよびサッポロウイルスの汚染状況を調べたところ、81件中12件からノーウオークウイルスが検出され、冬期に多い傾向が見られた。またA型肝炎ウイルスは3件から検出され、中国産の二枚貝の汚染が認められた。

F. 健康危険情報

A型肝炎ウイルスが検出された国名、貝種は厚生労働省担当課に連絡した。

G. 研究発表

1. 論文発表

新川奈緒美、上野伸宏、本田俊郎、吉国謙一郎、有馬忠行、湯又義勝、伊東祐治、増満弘史、田中義文、中野秀人、馬場俊行、中俣和幸、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。

2. 学会発表

なし

平成 13 年度厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究授業）
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 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

主任研究者	西尾 治	国立公衆衛生院
研究協力者	西 香南子	三重県保健環境研究所
	新川 奈緒美	鹿児島県環境保健センター
	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
	木村 博一	群馬県衛生環境研究所
	斎藤 美香	群馬県衛生環境研究所
	徳竹 由美	長野県衛生公害研究所
	川本 歩	鳥取県衛生研究所
	福田 伸治	広島県保健環境センター
	古田 敏彦	浜松市保健環境研究所

研究要旨

食品を介するウイルス性食中毒事例の 96%からノーウォークウイルス（NV）が検出され、ウイルス性食中毒事例は NV によるものであった。原因食材では生カキの喫食によるものが 38%と多くを占めていたことから、カキの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 40%程度を減少させることが可能と考えられた。検出された NV の遺伝子型は多様で、カキから検出された NV の遺伝子型と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。食品の安全性評価には原因食材の確保が不可欠である。

カキ以外の二枚貝による食中毒事例も発生しており、今後カキを含めて二枚貝のウイルス学的な安全性が求められる。

中国産のウチムラサキ貝による NV 感染、その 1 ヶ月後に A 型肝炎を発症した事例も認められた。今後、海外渡航歴のない A 型肝炎患者の発生時には輸入二枚貝の喫食調査を行う必要がある。

A. 研究目的

わが国における食品を介する食中毒事例について原因食材、発生患者数、発生状況、患者のウイルス検査成績等から、感染防止策の確立並びに食品の安全性評価の基礎データを蓄積し、食品のウイルス性食中毒事例発生防止を目的としている。

現在市販されている生カキおよびホタテ貝のウイルス汚染実態調査を行った。

B. 研究材料

疫学調査は集団発生 45 事例について行うと共に、ウイルス学的検査はこれら事例から得られた患者ふん便 373 件、従業員のふん便 98 件、吐物 6 件、食材ではカキ 9 件およびウチムラサキ貝 2 件について行った。

市販カキ 42 件およびホタテ貝 10 件から NV ならびに A 型肝炎ウイルス (HAV) の検出を行った。

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 16 事例からのふん便 83 件、カキ 18 件からおよびウチムラサキ貝 1 件 (分担研究者のも一部加えた)、計 102 件を用いた。

C. 研究結果

1) 集団発生状況 (表. 1)

食品を介する食中毒事例は 45 事例中 43 事例 (96%) から NV が検出された。また、中国産ウチムラサキ貝事例では NV と HAV の両方に患者が感染した。事

例は 12 月～2 月に多く見られたが、4 月は 5 事例と比較的多く、その他の月では 0～2 事例であった。原因施設は旅館・飲食店で多く発生したが、保育園、小学校、高校で各 1 事例が見られた。原因食品は不明が 24 件で最も多く、次いでカキの 17 件 (38%)、ウチムラサキ貝およびミル貝が 1 件、その他としてボイルエビ等が見られている。喫食者数は 2,888 名で、発症者は 1027 名であった。患者のふん便は 373 名から採取され、45 事例の患者 197 名から NV が検出された。従業員 98 人からのふん便のうち 18 件 (18%) から NV が見出された。吐物 6 件中 3 件 (50%) から NV が検出されたが、食材ではカキが得られた 4 事例から 8 件、ウチムラサキ貝 2 件が採取されたのみであり、カキ 2 件とウチムラサキ貝 1 件が NV 陽性でウイルス量はカキ 1 個当たり 200 コピーであった。

また、ウチムラサキ貝による集団発生の患者 15 名中 4 名のふん便から RT-PCR で NV genogroup (G1) 1 と G2 の両方が検出された。リアルタイム PCR 法の結果、4 名の便から $2.2 \times 10^5 \sim 6.3 \times 10^8$ copy/g の NV 遺伝子が検出された。従業員 5 名から NV は検出されなかった。

NV の食中毒発生から約 1 ヶ月後の 2002 (平成 14) 年 1 月 11 日から 16 日にかけて、上記のグループ中 4 名が A 型肝炎を発症した。リアルタイム PCR 法の結果、4 名の便から $1.5 \times 10^8 \sim 3.7 \times 10^9$ copy/g の HAV 遺伝子が検出