

された。その遺伝子配列では大アサリと患者 4 名からの分離株が genotype 1A で、96%以上の相同性が認められた。

本事例と同時期に 1 名の A 型肝炎患者発生があり、上記グループの 2 日前に同じ中華料理店で同一ロットの大ア

サリを喫食していた。リアルタイム PCR 法で便から 2.7×10^5 copy/g の HAV 遺伝子が検出された。遺伝子配列では 1A と分類され、大アサリからのものと 302 塩基が 100%一致した。

表 1. 食中毒発生事例

No	発生年月日	発生場所	原因施設	原因食品	喫食者数	患者数	患者	従事者	吐物	食品
							ふん便	ふん便		
							陽性数/ 検査数	陽性数/ 検査数	陽性数/ 検査数	陽性数/ 検査数
1	13/1/13	兵庫県	旅館	不明	46	24	1/5	0/1		
2	13/1/19	長野県	旅館	不明	308	174	6/7	3/7	1/1	
3	13/2/6	青森県	結婚式	不明	40	11	2/8			
4	13/2/7	青森県	家庭	カキ	4	4	1/1			0/1
5	13/2/15	長野県	旅館	不明	22	16	6/7	1/3		
6	13/2/17	佐賀県	不明	不明	11	10	3/6			
7	13/2/18	長野県	旅館	不明	53	36	3/3	2/6		
8	13/3/14	青森県	家庭	ポイルエビ	3	3	1/1			
9	13/4/7	鳥取県	飲食店	カキ	53	16	7/7	0/3		
10	13/4/22	青森県	老健施設	不明	130	21	0/5			
11		鳥取県	神社	手水舎水	100	68	9/11			
12	13/4/24/	鳥取県	飲食店	カキ	29	13	4/4	2/12		
13	13/4/27	鳥取県	飲食店	カキ	23	7	2/3	3/6		
14	13/4/29	青森県	修学旅行	不明	100	82	7/21			
15	13/5/1	青森県	小学校	不明	105	61	7/20		0/2	
16	13/5	青森県	不明	不明	不明	不明	1/45			
17	13/5/22	鳥取県	飲食店	カキ	38	11	7/11	0/2		
18	13/6/2	佐賀県	不明	不明	1089	104	3/14			
19	13/10/16	青森県	高校	不明	23	14	0/3			

20	13/11/8	青森県	保育園	不明	95	18	4/12		0/1	
21	13/11/18	長野県	仕出屋	不明	11	9	2/7	2/2		
22	13/12/3	三重県	家庭	不明	21	19	7/7			
23	13/12/7	長野県	飲食店	不明	142	79	14/14			
24	13/12/8	三重県	不明	不明	17	14	13/14			
25	13/12/10	浜松市	飲食店	ウチムラサキ貝	不明	15	4/4			1/2*
26	13/12/15	山口県	飲食店	ミル貝?	40	12	3/7			
27	13/12/17	佐賀県	不明	不明	43	28	2/3			
28	13/12/19	広島県	飲食店	カキ	不明	不明	2/2	1/1		
29		青森県	小児科	不明	不明	不明	1/3			
30	13/12/20	佐賀県	不明	不明	23	14	1/3			
31	13/12/21	三重県	飲食店	不明	29	18	6/10			
32	13/12/30	佐賀県	不明	不明	123	31	3/9			
33	14/1/4	広島県	飲食店	カキ	不明	不明	3/3	0/7		
34	14/1/15	長野県	旅館	カキ	14	9	4/4	1/4	1/1	0/1
35	14/1/16	青森県	飲食店	カキ	17	10	5/12			1/1
36	14/1/16	三重県	天理教 互助園	不明	44	15	5/15			
37	14/1/17	青森県	飲食店	カキ	27	17	7/11			0/5
38	14/1/20	山口県	家庭	カキ	5	5	3/3			
39	14/1/21	山口県	飲食店	カキ	16	14	10/11	1/3		
40	14/1/21	三重県	旅館	不明	4	4	3/3			
41	14/1/21	三重県	飲食店	カキ	17	7	2/4			
42	14/1/25	広島県	飲食店	カキ	5	3	3/4	1/12		
43	14/1/26	山口県	飲食店	カキ	8	3	2/2			
44	14/2/8	広島県	飲食店	カキ	不明	不明	16/19	1/29	1/1	
45	14/2/24	山口県	家庭	カキ	10	8	5/5			0/2
計				45 事例	2888	1027	200/373	18/98	3/6	2/11

*1 検体：HAV 陽性

2) 市販生カキおよびホタテ貝のウイルス汚染状況

市販カキ 42 件中 6 件から NV が検出された。ホタテ貝からは NV と HAV の両

ウイルス共に陰性であった。

3) 分子疫学的解析 (図 1、2)

患者ふん便から NV の G1 は 7 件、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 が検出された。

患者からの NV G1 では 8 事例から 7 つの遺伝子型が認められ、それらは ApplachicolaBay、Valetta、Southampton、KU19eG1、KU80G1、KU4aG1 類似のものとそれ以外が 1 遺伝子型であった。またカキからは Southampton、KU9eG1 と少し異なったもの、ウチムラサキ貝では Valett が検出されたが、いずれの少数であった。

G2 では 15 事例から Richimondo、Honolulu、BD004359、New Orleans、Amsterdam、Arg320、Miami の 7 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 はカキでのみ見出された。ウチムラサキ貝からは Honolulu、New Orleans、Arg320 が見られた。

D. 研究考察

NV による集団発生は冬期に多く発生することは良く知られているが、今回でも同様な成績であったが、4 月に 5 事例、5 月に 3 事例、6 月に 1 事例が発生し、必ずしも冬期のみの発生でないといえる。

原因食材では不明な事例が多く、今後この不明を明らかにしないと、NV による感染経路の解明は困難であり、感染拡大防止も不可能で、さらに詳細な調査が必要である。

従来、NV による集団発生は生カキの

喫食による事例が多く報告されており、今回の調査でも、17 事例 (38%) と多くを占めていた。カキの他にミル貝、ウチムラサキ貝による事例も見られ、カキを含めた二枚貝の NV のリスク評価が行われ、安全性が確保されればウイルス性食中毒事例の 40%を防止・減少させることができると予測される。

事例発生施設で注目すべきことは幼稚園、小学校、高等学校での集団発生であり、いずれも原因食材不明であった。この点に関して本研究の分担研究者の鈴木宏は保育所、小学校、新川奈緒美は高等学校で、杉枝正明らは幼稚園、小学校での (各先生の分担報告参照)、NV 集団発生を捉えており、これらは原因食材不明あるいは食品由来でないと報告している。いずれにしても、ウイルスが口から体内に入ったことにより集団発生が起きたもので、集団発生要因の解明が NV による感染拡大防止に重要であると考えている。さらに、分担研究者の新川は吐物を介して NV の感染拡大事例を捉えており、吐物中のウイルス量を調べ、汚物 1g 中に $10^3 \sim 10^5$ 個のウイルスに汚染されていた。NV に感染した乳幼児は嘔吐をしばしばする事から保育園、学校等の施設で起きた集団発生事例には吐物の処理が不十分で起きたものも含まれていると推察される。従って、吐物の処理に際してはプラスチックあるいはゴム手袋をして、市販の塩素系の漂白剤を 100 倍程度に希釈して、十分に浸すようにしてふき取ることが必要で、また、拭き取った雑

巾、ペーパータオル等は煮沸するなどのウイルスの不活化を徹底的に行うことが重要である。

また、従業員の18%からウイルスが検出され、この従業員の感染が患者と同一食品の喫食によるものかあるいは感染源で無いということを明らかにしなければならないし、時には感染源となっている可能性も考えられ、この点も事例毎に明確にしなければならない問題の一つである。

遺伝子解析では患者から NV の G1 では 8 つの遺伝子型が認められ、またカキから同一のものが 1 つ、G2 では患者から 8 つの遺伝子型が検出され、そのうちの 5 つがカキでも見られ、患者のカキ喫食との関連性が強く示唆された。

今後分子疫学的解析については、食材、二枚貝、河川、海水等について詳細に行い、ヒト-河川-海域-二枚貝-集団発生のサイクルについて系統的に明らかにすることにより、カキ等の二枚貝のウイルス学的安全性確保には浄化槽等の整備、河川水および海水のウイルス汚染防止策を含めた総合的な対策の必要性を明確に示すことができるものと考えている。

ウチムラサキ貝による NV の集団発生が起き、1 ヶ月後に A 型肝炎を発症した例では患者が喫食した大アサリは蒸し料理として提供されたものであるが、加熱不足により比較的耐熱性の NV と HAV が生残したと推測された。また、本大アサリは東京の業者が中国から輸入した冷凍品であった。A 型肝炎は潜

伏期間が 1 ヶ月程度と長いため、感染源が特定された例は少ない。本事例は原因食材である大アサリが NV と HAV の両方に汚染されており、始めに NV の食中毒が発生し、1 ヶ月後に A 型肝炎が発生した。この時点では疫学調査が進んでおり、保存されていた同一ロットの食材から HAV を検出し、感染源が特定された稀な事例であると思われる。本年度の厚生労働省の患者動向調査によると、A 型肝炎患者は 481 名で、この中には海外渡航歴が無く、発病している者も相当数含まれていると推察される。わが国では HAV は常存していないので、食品を介して発病した者も相当数含まれていると推測され、今後 A 型肝炎患者については疫学および喫食調査を詳細に行う必要がある。

今後、輸入二枚貝による HAV による感染防止に努めると共に、二枚貝の喫食に際しては十分に加熱するように教育することが必要である。

E. まとめ

食品を介するウイルス性食中毒事例 45 事例について調査したところ、45 事例中 43 事例から NV が検出され、原因ウイルスは NV が殆どを占め、患者から検出された遺伝子型は多様であったが、カキから検出された遺伝子型と患者と同一のものが認められた。

事例は 12 月から 2 月に多発したが、4 月にも多く見られた。原因食材はカキによるものが多く認められた。

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。

F. 健康危険情報

集団発生事例はそれぞれの自治体から厚生労働省に報告を行った。

G. 研究発表

1. 論文発表

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、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一鹿児島県一。病原微生物検出情報, 22:222-223、2001

KADOI, K., SUZUKI, H., and NISHIO, O. Isolation of Cosackievirus B5 from Pigs. *Microbiologica* 24:

217-222. 2001

2. 学会発表

生カキ食中毒で検出したノーウオークウイルス株と小児急性胃腸炎検出株間の関連性、平成12年度日本獣医公衆衛生学会、2001、2、9-11、P2、奈良市

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

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 NV 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 Okitsu, Osamu Nishio, Yumiko Kato, Hiroshi Ushijima, Sporadic cases of Norwalk-like virus infection in 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

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

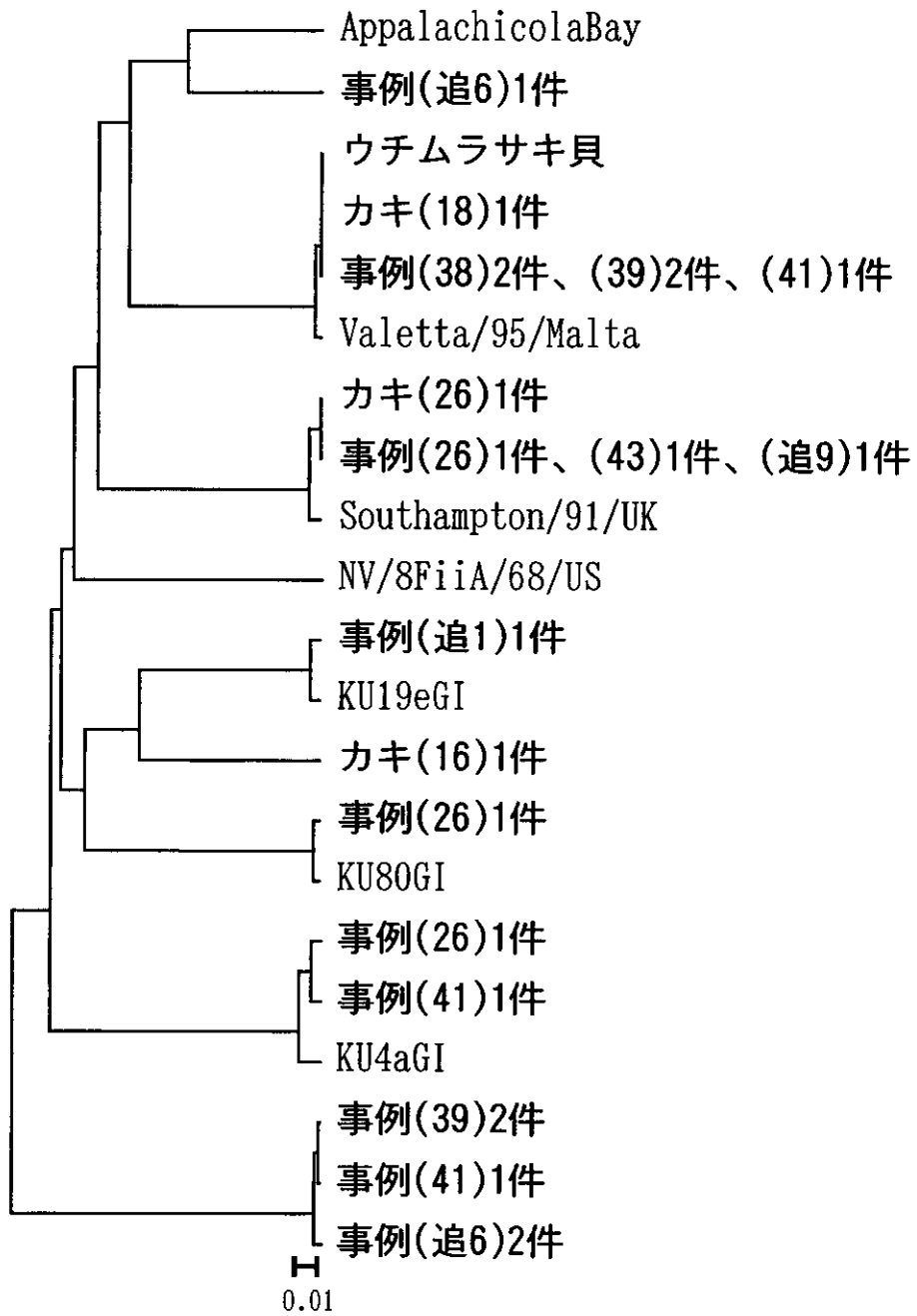


図1. 検出されたノーウォークウイルスG1の系統解析

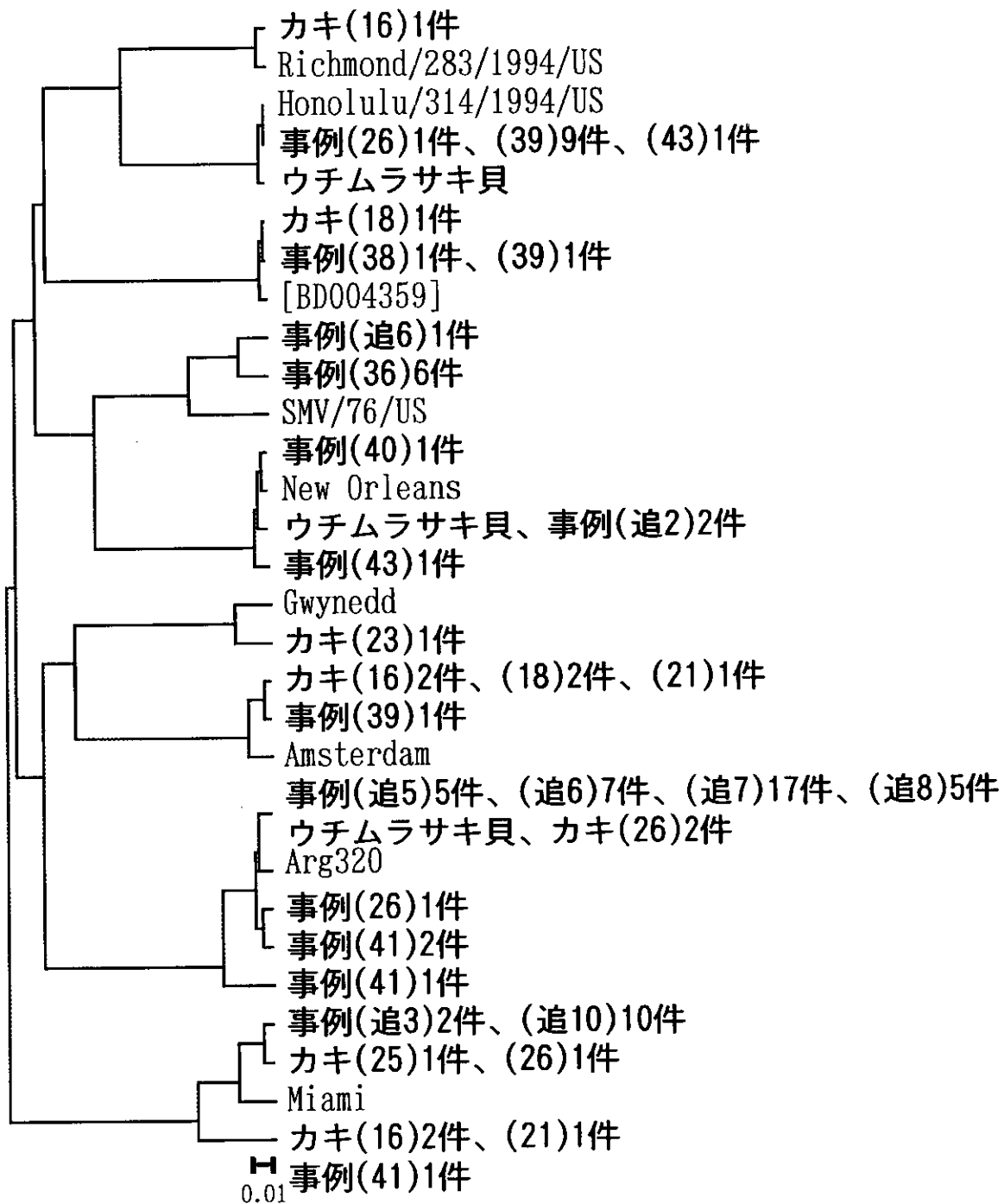


図2. 検出されたノーウオークウイルスG2の系統解析

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 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

分担研究者 春木孝祐 大阪市立環境科学研究所 微生物保健課長

協力研究者 勢戸祥介、入谷展弘

研究要旨

今回用いたリアルタイム PCR によるノーウォーク様ウイルス (NLV) 検出法は、特異性および迅速性に優れ、ウイルス量を定量できることから、食品等の NLV 汚染状況の実態調査に有用であると考えられた。NLV の新しいプライマーおよびプローブの設定を行ない、NLV の検出精度を向上させた。また、市販カキ 32 検体についてリアルタイム PCR を用いて A 型肝炎ウイルスの検出を試みたが、A 型肝炎ウイルスは検出されなかった。

A. 研究目的

ノーウォーク様ウイルス (NLV) 分離株およびウイルス性食中毒事例由来の患者便・保存食などを材料として、リアルタイム PCR を用いた NLV の検査法と従来用いられてきた RT-PCR による検査法について特異性・感度について比較し、リアルタイム PCR による検査法の有用性を検討する。

リアルタイム PCR による NLV 検査法を用いて、食品および環境中の NLV 汚染実態調査を実施し、汚染状況の把握を行う。

B. 研究方法

材料：(1) 種々のプローブ型の NLV 分離株 22 株 (P1A 型 2 株、SOV 型 1 株、P1B 型 9 株、P2A 型 1 株、P2B 型 3 株、96065 型 3 株、アルファトロン型 3 株)。(2) 平成 13 年 10 月から平成 14 年 1 月にウイルス性食中毒が疑われた 26 事例 (患者糞便 137 検体)。(3) NLV 食中毒事件の原因究明のために搬入された食品 4 事例 19 検体 (保存食

17 検体、カキ 2 検体)、施設の拭き取り水 1 事例 5 検体、平成 13 年 10 月から 12 月に購入した市販カキ 32 検体 (カキ 3 個プール/1 検体)。(4) 平成 11 年 10 月から平成 12 年 3 月に一定点において採取した河川水 13 検体。

NLV の検出：(1) リアルタイム PCR は影山らの方法 (Vita, 18, 2001) に従って、TaqMan Universal PCR Master Mix (ABI 社)、COG1F/R、RING1-TP(a)/(b) および COG2F/R、RING2-TP を用いて、ABI7700 (ABI 社) でリアルタイム PCR を行ない、遺伝子型別 (genogroup 1、genogroup 2) にコピー数を測定した。(2) RT-PCR は SR33/48・50・52 および SR33/46 を用いて NLV 遺伝子を増幅しプローブハイブリダイゼーションにより型別を行った (検食については SR33/NV82・SM82 で 1st PCR 後 nested PCR を行った)。

C. 研究結果

(1) NLV 分離株 22 株を用いた特異性の検討は、アルファトロン型を除くプローブ型 (genogroup 1: P1A 型・SOV 型、genogroup 2: P1B 型・P2A 型・P2B 型・96065 型) の NLV を検出することが可能であった。また、アルファトロン型については目的の領域 (COG2R/F) を含む約 600bp を RT-PCR で増幅しダイレクトシークエンスにて塩基配列を決定し、COG2 F および RING2-TP 相当領域にプライマー (ALPF: TTTGAGTCCATGTACAAGTGGATGCG) およびプローブ (ALP-TP: TGGGAGGGGATCGCGATCT) を設計することによりアルファトロン型を検出することが可能となった (ただし、スタンダードの準備はできていない)。

(2) ウイルス性食中毒が疑われた事例では、リアルタイム PCR により NLV が検出された事例は 16 事例 (61.5%、74 検体: 54.0%) であり、RT-PCR で NLV が検出された事例は 14 事例 (53.8%、45 検体 32.8%) であった。リアルタイム PCR 陽性/RT-PCR 陰性が 38 検体、リアルタイム PCR 陰性/RT-PCR 陽性となるものが 9 検体認められた。リアルタイム PCR では 1 コピー/1 反応から検出可能であったが、RT-PCR では 240 コピー/1 反応が検出限界であった。

(3) リアルタイム PCR では保存食 1 検体 (1-2 コピー/1 反応)、生食用カキの喫食による NLV 食中毒事例の残品 (カキ 1 個) から 10 コピー/1 反応の NLV が検出され、RT-PCR では平成 13 年 12 月に購入した市販カキ 3 検体 (P2A 型 1 検体、P2B 型 2 検体) から NLV を検出した。

(4) 平成 11 年 12 月から平成 12 年 3 月に採取した河川水 8 検体から NLV を検出した (genotype 1 は 6 検体 2-2200 コピー/ml、genotype 2 は 7 検体 7-1600 コピー/ml)。

RT-PCR により河川水 2 検体から NLV (P1B, P2A, P2B 型の混合) を検出した。

D. 考察

リアルタイム PCR による NLV 分離株 22 株の検出は、アルファトロン型を除くプローブ型 (P1A, SOV, P1B, P2A, P2B, 96065 型) を検出することができた。アルファトロン型については、プライマーおよびプローブを追加することにより検出可能となった。NLV の遺伝学的性状については不明な点も多く、アルファトロン型と同様に今回のリアルタイム PCR では検出できない型も存在する事から、新しい型の NLV を検出できる様に監視が必要であると考えられた。ウイルス性食中毒が疑われた事例由来の患者便では、リアルタイム PCR では数コピー/1 反応から NLV が検出可能であったが、RT-PCR では 240 コピー/1 反応が検出限界であった。しかしながら、リアルタイム PCR 陰性で RT-PCR 陽性となる患者材料が認められ、ウイルス RNA の抽出方法等さらに検討を加える必要がある。

NLV 食中毒事件の原因究明のために搬入された食品では、事業所給食の保存食 1 検体からリアルタイム PCR により NLV を検出することができたが、原因となった食材の特定はできなかった。生食用カキの喫食による NLV 食中毒事例の残品 (カキ 1 個) から NLV が検出された、同一ロット (未開封) のカキ (3 個プール) からは NLV を検出することはできなかった。また、市販カキを 3 個ずつプールして行った検査ではリアルタイム PCR では NLV を検出することはできなかったが、RT-PCR で NLV を検出することができた。今後カキにおける汚染実態の把握のために NLV の定量は重要であると考えられる事から、カキからのウイルス RNA 抽出法を簡便化し、カキ 1 個あたりの NLV の

汚染量を調査していく必要があると考えられた。

NLV が検出された河川水から遺伝子を単離し塩基配列を決定したところ、同時期に検出されたヒト由来NLVと高い相同性を有しており、河川がヒト由来NLVに汚染されていると考えられた。

E. まとめ

今回用いたリアルタイムPCRによるノーウォーク様ウイルス(NLV)検出法は、特異性および迅速性に優れ、ウイルス量を定量できることから、食品等のNLV汚染状況の実態調査に有用であると考えられた。NLVの新しいプライマーおよびプローブの設定を行ない、NLVの検出精度を向上させた。また、市販カキ32検体についてNLVは9%から検出されたが、A型肝炎ウイルスは検

出されなかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

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

入谷、春木、他、河川水からの Norwalk virus の検出、生活衛生（投稿中）

2. 学会発表

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

G. 知的所有権の取得状況

なし

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

分担研究者 西 香南子 三重県科学技術振興センター保健環境研究部研究員

研究要旨

2001年10月から2002年2月25日まで県内のカキの養殖海域3カ所に4定点を定め、1定点につきカキ5個を採取し、Norwalk virus (NV)の検出を行った。また、2海域の定点で海水を採取し、同様にNVの検出を行った。カキでは1月からNVが検出され、2月最終週では陰性となった。海水では全期間をとおしてすべて陰性であった。カキ採取時の海水温・比重、気温及び降水量とカキからのNV検出状況の関連性を検討したところ、海水温が10℃以下になるころからNVが検出されはじめた。その他の因子については直接的な関連性は認められなかった。

A. 研究目的

小型球形ウイルス（SRSV）が原因物質として疑われる食中毒事例では原因食品としてカキが関与しているものが多く見られる。そこで、1997年に食品衛生法が改正され、食中毒の原因物質としてSRSVが加えられた。三重県は養殖カキの生産県であるため、生食用生カキの安全性を確保する目的で1997年から定点におけるNVの調査を始め様々な研究を行ってきた。今年度はカキの養殖海域3海域に4カ所の定点を定め、各定点5個のカキを採取し、NVの汚染状況を調査した。また、海域の海水を採取し、NVの汚染状況を調査するとともに、気温、雨量等の環境因子の関連性からカキのNV汚染状況の推定の可能性について検討した。

B. 研究方法

1. 採取期間及び検体

県内でカキの養殖を行っている3海域のうち2海域には各1カ所（A・D）、1

海域には2カ所（B・C）の定点を定め、カキの採取を行った。採取は2001年10月から2002年2月25日まで9回実施した。1回の採取では定点につき5個のカキを採取した。海水は各海域でカキ養殖筏付近の海水20Lを2001年12月から2002年2月25日まで7回採取した。

2. カキの前処理

カキは中腸腺を摘出後、4倍量のPBS（－）を加えホモジナイズした。3000rpm、15分遠心後、上清に24%PEG/1.5M NaClを加え4℃で一晩放置した。3000rpm、30分遠心し、沈渣を1,1,2-トリクロロ-1,2,2-トリフルオロエタンを加えて攪拌後9000rpm、20分遠心した。上清に24%PEG/1.5M NaClを加え4℃30分以上放置した。12000rpm、30分遠心し、沈渣をEagles' MEM 500μLに浮遊し、RNAの抽出に用いた。

3. 海水の前処理

2月4日採取分までは陽電化膜法、2月12日採取分以降は陰電化膜法により

NV の濃縮を行った。陽電化膜法では海水を pH5 ~ 6 に調整後、陽電化フィルター (0.45 μ m) で濾過する。フィルターはアルカリ溶液 (3% Beef extract; 1% NaCl; 15% NaNO₃; pH9.0) に浸し、4 °C 1 時間放置後アルカリ溶液を回収した。3000rpm, 20 分遠心後上清に 16% PEG/0.8M NaCl を等量加え、4 °C で一晩放置する。3000rpm, 30 分遠心後、上清を廃棄し、沈渣を Eagles' MEM 500 μ L で再浮遊し RNA の抽出に使用した。

陰電化膜法では海水を陰電化フィルター (0.45 μ m) で濾過後、1/1000N H₂SO₄ 2L で洗浄した。1/1000N NaOH 45mL でフィルターを浸し 5 分放置後、0.1M H₂SO₄, 100 × TE Buffer を入れた遠心管に回収した。回収した液を 35,000rpm, 3 時間遠心し沈渣を Eagles' MEM 500 μ L で再浮遊し RNA の抽出に使用した。

4. RNA の抽出

RNA は QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて抽出し、DNase I で 37 °C 30 分反応させ DNA を分解後、Super Script RT II (Invitrogen) で 42 °C 1 時間反応させ cDNA を作製した。

5. PCR

作製した cDNA は capsid 領域を標的とする G1-SK 系 (1st:COG1F/G1-SKR, nested:G1-SKF/R), G2-SK 系 (1st:COG2F/G2-SKR, nested:

G2-SKF/R), COG1 系 (1st:COG1F/G1-SKR, nested:COG1F/R), COG2 系 (1st:COG2F/G2-SKR, nested:COG2F/R), と polymerase 領域を標的とする NV 系 (1st:NV-35/36, nested:NV-81/82, SM-82), Yuri 系 (1st:Yuri52F/R, MR-3/4, nested:Yuri22F/R) の primer set とし、Ex Taq polymerase (TaKaRa) 又は Z-Taq polymerase (TaKaRa) を用いて PCR を行った。PCR 産物は 1.5% agarose gel で電気泳動を行い、ethidium bromide で染色し、判定を行った。陽性となった PCR 産物は capsid 領域を標的とするものは国立公衆衛生院、polymerase 領域を標的とするものは国立感染症研究所にシーケンスを依頼した。

また作製した cDNA は国立公衆衛生院に送付し、realtime PCR による定量を行った。

C. 研究結果

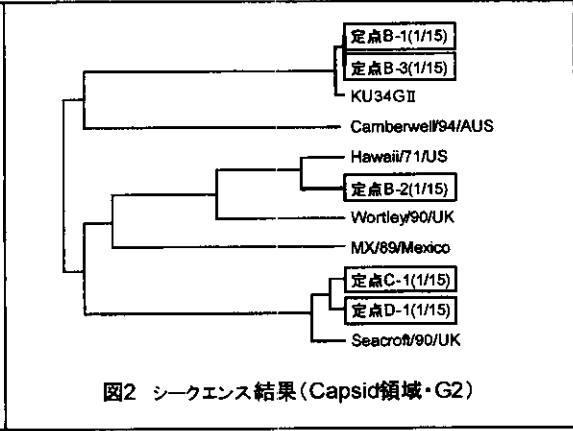
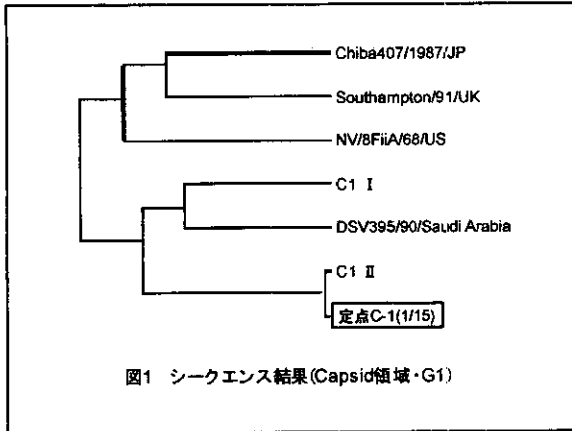
1. カキおよび海水の NV 検出状況

各定点で採取したカキの NV の検査結果を表 1 に示す。PCR は 6 種類の primer set のいずれかで陽性となったものを NV 陽性とし、表には陽性となった個数を示した。なお、海水では全期間をとおして NV は検出されなかった。

陽性となった PCR 産物は公衆衛生院及び感染症研究所にシーケンスを依頼した。その結果を capsid 領域は図 1, 2 に示す。polymerase 領域は 1 検体のみ陽性であり Southampton 類似株であった。

表1 定点で採取したカキのNV検出結果

定点	10/9	11/12	12/10	1/15	1/26	2/4	2/12	2/18	2/25
A	0	0	0	2	1	1	0	0	0
B	0	0	0	3	4	2	0	1	0
C	0	0	0	3	4	1	1	1	0
D	0	0	0	2	3	1	1	1	0



2.カキ採取時の気象状況

定点のカキ採取時に測定した海水の温度及び比重を図3,4に示す。NVが陽性となったカキの採取月日を線で囲った。また、海域近辺の消防署の観測データに

示された12月から2月までの気温及び降水量は図5,6のとおりで、図中の矢印はカキの採取日を示し、NVが陽性となった採取日の矢印は塗りつぶした。

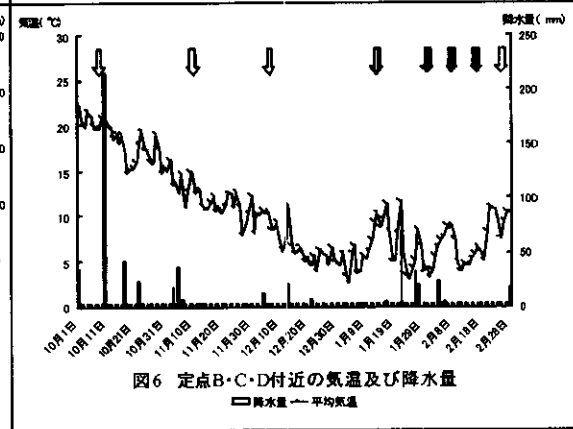
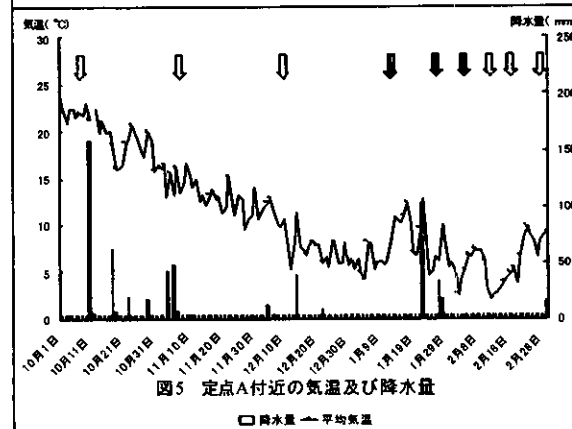
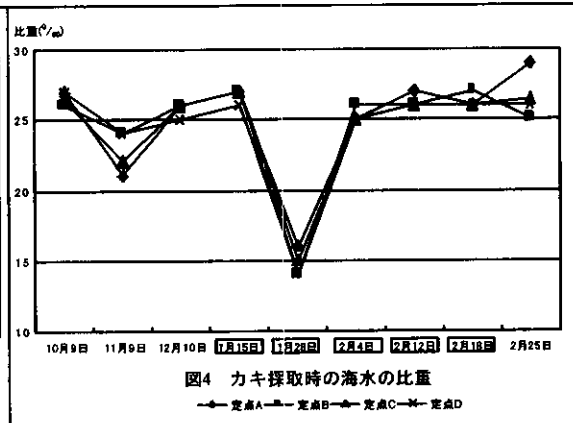
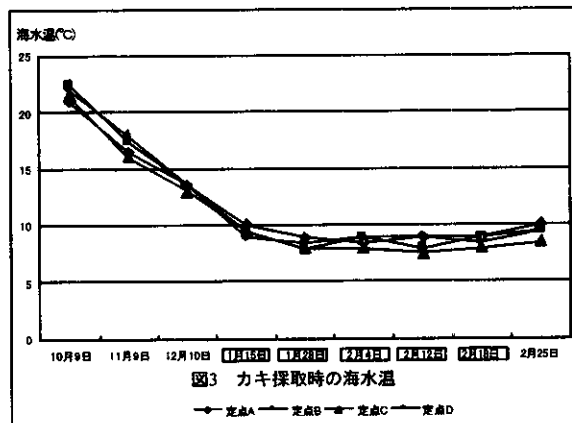


表2 realtime PCRとRT-PCRの相関性

			RT-PCR				
			G1		G2		
			+	-	+	-	
realtime PCR	G1	+	(copy数)				
		$\sim 10^2$	5	22	ND.	ND.	
		$10^2 \sim$	0	1	ND.	ND.	
	-	9	157	ND.	ND.		
	G2	+	$\sim 10^2$	ND.	ND.	4	29
		$10^2 \sim$	ND.	ND.	2	0	
-		ND.	ND.	8	151		

ND.:not Data

3.RT-PCR と realtime PCR の相関

作製した cDNA は国立公衆衛生院で realtime PCR による定量を行った。その結果と RT-PCR の結果の相関を表 2 に示す。

RT-PCR 陰性となった G1 では 160 検体のうち realtime PCR では 10^2 copy 未満で 21 検体 10^2 copy 以上が陽性となった。また同様に G2 では realtime PCR では 10^2 copy 未満で 29 検体が陽性となった。

D. 考察

今年度の定点で採取されたカキは 1 月から 2 月中旬まで NV 陽性となり、2 月最終週にはすべて検出されなくなった。海域別では定点 A の海域の方は 1 月から 2 月第 1 週まで検出された。定点 B・C・D の海域の方は 1 月から 2 月最終週まで検出された。定点 A の海域よりも定点 B・C・D の海域の方が NV が検出された期間が長かった。定点 B・C・D の海域は伊勢湾から太平洋へ放出される海流がある海域であり、定点 D が最も伊勢湾の海流の上流にあたり、定点 B・C はその下流にあっている。それに対し定点 A は太平洋に面した湾となっており、伊勢湾から放出された海流の影響を直接受けることは少なく、また、流入する大きな河川も存在しないことから、

外部から流入する可能性が低いことが考えられ、NV の検出期間、検出数とも少なかったことが考えられる。しかし、今までの調査では定点 A の海域の方が常に少なかったわけではなく、また、検出期間、検出数等も年による変動が大きく今後も調査を継続するとともに、これらの影響を与える因子を解明していく必要性が考えられた。

海水では採取期間をとおして NV は検出されなかった。これには海水から検出可能な量まで NV を十分に濃縮できていないことが考えられる。また、カキは 1 時間に約 18L の海水を取り込んでいると言われており、検査に使用している海水量がカキの採取する海水量に比べて少ないことがカキで検出されていても海水で検出されない原因の 1 つであると考えられる。

カキの NV 汚染状況に影響すると考えられる環境因子として海水の温度、比重、気温及び降水量との関連性を検討した。今までの調査においても海水温が 10°C 以下になると NV が検出されるカキが増えており、今年度も同様の状況が認められた。これにはカキの生理活性が関与していることが考えられる。カキは海水を濾過してプランクトンなどを取り込み、

中腸線の細胞が食作用により細胞内消化を行っている。NV はプランクトン等とともにカキ体内に取り込まれることが推察される。海水温の低下により細胞内消化能力が低下しプランクトンや NV 等の消化が不完全となり、陽性となることが考えられた。降水量・比重については 1 月 28 日には陽性となった個体数が多く、その際の比重は下がっていた。比重の低下は 1 月 26, 27 日の降水量が 1 月 28 日の採取時に海水の比重の低下に影響を与えていたものであるが、それ以外の採取日の比重と NV 陽性に関連性は認められなかった。今までの調査では比重の低下が NV の陽性数の増加に関与していることが推測されたが、今回の調査では降水量や比重の直接的な影響は認められなかった。下水処理場の流入水には年間を通して NV が検出されているが、流出水には NV は検出されていない又は冬季の流行の見られる時期でのみ検出されるという報告がある。今シーズンは 12 月から 1 月にヒトの間での流行があり、下水処理場には多量の NV が流入していたことが考えられる。降雨によって下水処理場への流入水が増加し NV を含む流出水が放流され、また、多量に河川水が海域内に流入したことにより NV の陽性数が増加したことが推測され、海水の比重との関連性も示唆された。気温については直接影響しているとは考えにくい。海水温の推測をするための一助とすることは可能であると考えられた。

今回の調査では realtime PCR 法による定量を試みた。RT-PCR 法との相関性では RT-PCR 法で陰性となった検体で G1 では 23 検体、G2 では 29 検体が陽性となった。しかし、copy 数の少ないも

のについては再現性に問題があることが報告されており、realtime PCR 法による定量については検討を続ける必要があると考えられた。

E..結論

今年度の調査では NV が検出されたカキは 1, 2 月に集中していたが、今までの調査では 12 月から検出されることもあり、検出期間や検出数には年による変動が大きいことが認められた。また、同じ養殖筏から採取したカキでも NV 汚染状況が異なっており、カキの個体差もあることが考えられる。カキの NV の汚染についてはカキだけではなく、その周囲を取り巻く様々な環境からの影響があり、それらの因子が直接・間接的に関与していることが考えられ、今後も継続してカキでの NV 検出状況を調査するとともに、環境因子についても調査し指標とできる因子の検討を続ける必要があると思われた。

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 海域のウイルス汚染状況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

分担研究者 新川奈緒美 鹿児島県環境保健センター 微生物部主任研究員

研究要旨

鹿児島県における海域のウイルス汚染実態を把握するために、自生カキ、プランクトン、海水、県産のヒオウギ貝からの Norwalk virus (NV)、Sapporo virus (SV)、A 型肝炎ウイルス (HAV) の検索を試みた。その結果、2001 年 12 月に採取されたヒオウギ貝から NV (G1) が 6,780copy/個検出され、2000 年 6 月に始良郡福山町で採捕した自生カキから SV が 3,229copy/個検出された。このことから、海域がヒトのふん便などで汚染されていることが明らかになった。

また、胃腸炎集団発生事例について患者検体及び食材から原因ウイルスの検索を行ったところ、10 事例の患者検体から NV が検出され、G1 が 2 事例、G2 が 7 事例、G1G2 混合が 1 事例であった。それらの遺伝型を調べたところ、G1 は 5 つ、G2 は 6 つの遺伝子型によるものであった。さらに、患者の吐物中のウイルス量は、 $6.4 \times 10^3 \sim 1.5 \times 10^5$ copy/g (G2) と大量にウイルスが存在していたことから、吐物が不適切に処理されるとヒトからヒトへの伝播、またはエアロゾルによる感染により、二次的な集団発生が起これ、感染が拡大・長期化する危険性が示された。

A. 研究目的

下痢症ウイルスは、ヒトの間で感染を繰り返しながら、患者のふん便や吐物と共に排泄された大量のウイルスが河川、さらには、海域を汚染しており、そこに生息する生物は、これらのウイルスの暴露を受ける。そして、ウイルスに汚染された二枚貝などが感染源となり、これをヒトが摂取することにより、再びヒトに感染するサイクルが繰り返されていると考えられている。

厚生労働省に届けられたわが国の 2000 年の食中毒事件発生状況によると、ウイルス性食中毒は、食中毒事件総数 2,247 件のうち 247 件 (11%) で、その中でも NV に因るものが 245 件で 99% を占めていた。また、病因物質別の患者数では、ぶどう球菌 (14,722 人) に次いで 2 番目に多い 8,080 人 (全体の 19%) で、NV による食中毒事件の発生は、社会的にも大きな問題となっている。

そこで、2001 年 4 月から 2002 年 2 月ま

でに鹿児島県下で発生し、当センターに検体が搬入されたウイルス性食中毒の発生状況を調査し、原因ウイルスおよび原因食品を追究した。

また、環境水中のウイルス汚染状況を把握するために、自生カキ、プランクトン、海水、県産ヒオウギ貝の NV、SV、HAV を検索し、海域のウイルス汚染実態を把握した。さらに、検出されたウイルスについて、遺伝子配列を決定し分子疫学的に解析した。

B. 研究方法

1) 検査材料

自生カキ：2000年4月から2001年3月にかけて採取した県内6地点の自生カキ72件および2001年10月から2002年2月に採取した1地点の自生カキ5件、計77件を検査に用いた。

プランクトン：2001年10月から2002年2月の期間に1地点の海水5リットル中のプランクトン4件を用いた。

ヒオウギ貝：2001年10月から2002年2月に買い上げたヒオウギ貝25個の中腸腺25件を用いた。

海水：2001年11月に採取した海水10リットルを調べた。

胃腸炎集団発生事例：2001年4月から2002年2月に発生した胃腸炎集団発生10事例のふん便76件、吐物9件、食材43件の計128件

2) 方法：自生カキは、摘出した中腸腺を5gプールし、ヒオウギ貝は、摘出した中腸腺をプールせずに、それぞれPBSで20%乳剤とした後、10,000rpm、20min遠心した。その上清を30%シュークロースに重層後、35,000rpm、180min遠心し、peletを500 μ lの蒸留水(DNase、RNase free)に再浮遊し、

それをRNA抽出に用いた。プランクトンは、5リットルの海水中のプランクトンをストッキングで回収し、3000rpm、30min遠心後、そのpeletを500 μ lの蒸留水(DNase、RNase free)に再浮遊し、それをRNA抽出に用いた。胃腸炎集団発生事例のふん便および吐物は、PBSで10%乳剤とし、3000rpm、30min遠心後、その上清をRNA抽出に用い、食材は、超遠心後、peletを500 μ lの蒸留水(DNase、RNase free)に再浮遊し、RNA抽出に用いた。

RNAは、QIAmp Viral RNA Miniキット(QIAGEN)を用いて抽出し、DNase I (TaKaRa)処理後、random hexamer (Amersham Pharmacia)を用いてSuper Script™ II RT (Invitrogen)で逆転写し、cDNAを作製した。cDNAの30 μ lは国立公衆衛生院に送付し、TaqMan Universal PCR Master Mix (ABI社)を用いてReal Time PCRを実施した。胃腸炎集団発生事例の検体については、1st PCRをCOG1F/G1SKR、COG2F/G2SKRを用いてNVの検出を試み、食材については、COG1F/COG1R、G1SKF/R、COG2F/COG2R、G2SKF/Rを用いてnested PCRを行った。PCR産物は、RING1、RING2プロンプを用いて、ハイブリダイゼーションを行った。

PCR産物を用いダイターミネーター法で遺伝子配列の決定を行い、系統樹解析を実施した。

C. 研究結果及び考察

表1にヒオウギ貝、自生カキ、プランクトン、海水からのウイルス検出状況を示した。ヒオウギ貝からは、2001年12月に採取された検体からNV(G1)が6,780copy/個検出された。自生カキは、2000年6月に始良郡福山町で採捕した検体からSVが

3, 229copy/個検出された。プランクトンおよび海水は、NV、SV、HAVのいずれも検出されなかった。このことから、NV、SVは、10個から100個でヒトに発病させるので、ヒオウギ貝、自生カキを摂食した場合に発症させる十分量であることが判明した。また、ヒオウギ貝、自生カキから下痢症ウイルスが検出されたということは、海域がヒトのふん便などで汚染されていることを表している。このことから、海域にヒトのふん便等が流出しないように公共下水道などのウイルス対策も含めて、環境の整備が緊急の課題であると思われる。

2001年4月から2002年2月までに発生した胃腸炎集団発生事例は、11事例中10事例からNVが検出された(表2)。事例4は、会食数日前から胃腸炎患者がおり、嘔吐した有症者の吐物の不適切な処理等により家庭内や忘年会会場でも感染が拡大したと考えられ、食中毒事件としては扱わなかった。事例10は、共通食がなかったことから、大会会場で嘔吐した患者の吐物が端を発したairborneと推定された。その他の8事例は、食中毒と断定された。原因食品の中で貝が直接関連していた事例は、事例1の「貝マヨネーズ焼き」に用いたウチムラサキ貝(中国産、加熱用)、事例2の「寄せ鍋」に入れたカキ(広島産、加熱用)、事例6の「酢の物」に用いたバカガイ(推定、産地不明)であった。事例1、2は、貝の不完全加熱が原因で発生したと推定され、事例6は、バカガイの不完全加熱が原因であるばかりでなく、加熱前後の貝の取り扱いが同一タンクで行われていたことで二次感染を引き起こした可能性も考えられた。このことから、貝の取り扱いについて調理従事者へ教育の徹底化が必要であると思われる。

事例3、5、7、8、9は原因食品を特定することはできなかったが、食品媒介と推定された。

発生時期は、7月に徳之島で発生した事例1を除き、冬季に集中していた。遺伝子型は、G1が事例1、9の2事例、G2が事例2、3、4、5、7、8、10の7事例で、事例6は、G1とG2が同時に検出された。このことから、2001年4月～2002年2月に当センターに搬入された集団胃腸炎事例で検出されたNVの遺伝子型は、G2が主流であったが、G1との混在であることが判明した。

遺伝子解析は(図1、2)事例1、2、3、4、6、9、10について行ったところ、G1では事例1の患者便はKU19eG1、原因ウチムラサキ貝ではVletta/95/Malta類似で患者便と原因食材とは一致しなかった。また、事例6の患者便では2つの異なった遺伝子型が認められた。事例9の患者便から検出されたNVはSouthampton/91/UKに類似であった。G2では7つの遺伝子型が認められ、事例1のウチムラサキ貝と、事例2の患者便がほぼ同一であった以外は全て異なった遺伝子型であった。従って、今年度のNVによる集団発生は多様な遺伝子型によって起きていたことが明らかとなった。なお、事例1は中国産のウチムラサキ貝によって起きたものである。

NV陽性患者の臨床症状は、下痢(74%)、嘔吐(66%)、嘔気(59%)、腹痛(57%)が主症状であった。下痢便の性状は、多くが水様便や軟便であったが、事例7では、粘液便が大半を占めていた。そこで、大腸菌との混合感染を考慮し、易熱性毒素(LT)、耐熱性毒素(ST)、侵入性因子(inv)、志賀毒素(VT)の検出をPCRで行ったが、いずれの毒素も検出されなかったことから、

NVの単一感染であると推定された。

NVに感染すると、小腸粘膜細胞の組織的破壊により、水分の吸収障害を起こし、そのために下痢が亢進すると考えられている。しかし時には、粘膜に侵入・増殖後、白血球関与の炎症を惹起して病巣を拡大し、細胞を脱落させた結果として、水分の吸収障害から下痢が起きている可能性もあると推察されるが、今後さらに検討したい。

患者検体から検出されたNVのウイルス量は、ふん便検体で $3.5 \times 10^4 \sim 9.2 \times 10^9$ copy/g、吐物は $6.4 \times 10^3 \sim 1.5 \times 10^5$ copy/gと多く含まれており、ふん便中のウイルス量には、検体により大きな差がみられた(表3)。その要因の1つとして、発病後日数と関連していると思われたが、いずれも大量のウイルスが存在していた。吐物は、発症中の検体であり、ふん便に比べれば少ないものの、量的には多く含まれていた。NVは通常10個～100個でヒトに発病させると言われていたことから、吐物が飛び散った場合に多くのヒトを感染させる量であることが判明した。従って、吐物が不適切に処理されると、ヒトからヒトへの伝播、またはエアロゾルによる空気感染を成立させることになり、二次的な集団発生が起これ、感染が拡大し、長期化する危険性があり、吐物の適切な処理方法も含めた衛生教育が必要である。

食中毒などの集団発生の原因や汚染源を迅速かつ正確に特定することは、患者へ適切な治療方法を決定することに寄与できるばかりでなく、集団発生の拡大や二次感染の発生を未然に防止することが可能であり、食品衛生ならびに、公衆衛生上からも非常に重要であるといえる。この研究では、衛生教育、予防対策を講じる上でも有用な

データが得られ、今後も継続して研究していきたいと考えている。

D. まとめ

鹿児島県における海域のウイルス汚染実態を把握するために、自生カキ、プランクトン、海水、県産のヒオウギ貝からのNorwalk virus (NV)、Sapporo virus (SV)、A型肝炎ウイルス (HAV) の検索を試みた。その結果、2001年12月に採取されたヒオウギ貝からNV (G1) が6,780copy/個検出され、2000年6月に姶良郡福山町で採捕した自生カキからSVが3,229copy/個検出された。

また、胃腸炎集団発生事例について患者検体及び食材から原因ウイルスの検索を行ったところ、10事例のうち7事例について遺伝型を調べたところ、G1は5つ、G2は6つの遺伝子型によるものであった。さらに、患者の吐物中のウイルス量は、 $6.4 \times 10^3 \sim 1.5 \times 10^5$ copy/g (G2) と大量にウイルスが存在していたことから、吐物が不適切に処理されるとヒトからヒトへの伝播、またはエアロゾルによる感染により、二次的な集団発生が起これ、感染が拡大・長期化する危険性が示された。

E. 研究発表

1. 論文発表

新川奈緒美、西尾 治他；ウチムラサキ貝が原因で夏季に発生したノーウォ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 (Vol. 22 No. 9, 12-13, 2001年9月発行)

2. 学会発表

新川奈緒美、永田告治、西尾 治；鹿児