

島県における胃腸炎集団発生事例及び自生  
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、名  
古屋、2001

F. 知的所有権の取得状況  
なし

表1 検査材料からのウイルス検出状況(copy/個, Real time PCR)

検査材料	例数	陽性数	NV		SV	HAV
			G1	G2		
ヒオウギ貝	25	1	6,780	0	0	0
自生カキ	77	1	0	0	3,229	0
プランクトン	4	0	0	0	0	0
海水	1	0	0	0	0	0

表2 集団発生事例検体(患者糞便・吐物)から検出されたNV

事例	発生年月	発生地管轄保健所	患者概要	患者数	発症率(%)	原因食品等	症状*	PCR陽性/患者検体	Real time PCR(G1)	Real time PCR(G2)	遺伝子型
1	2001.7	徳之島	職場宴会	23	74.2	ウチムラサキ貝	下痢(100%)嘔気(0%)嘔吐(1%) 発熱(1%)腹痛(1%)発熱(33%)	2/6	2/2		DSV近似
2	2001.11	加治木	家庭	3	60.0	カキ(寄せ鍋)	下痢(100%)嘔気(100%)嘔吐(100%) 腹痛(1%)発熱(0%)	2/2		2/2	SMV近似
3	2001.12	出水	職場宴会	8	40.0	会席料理	下痢(50%)嘔気(100%)嘔吐(50%) 腹痛(50%)発熱(0%)	2/3		2/2	Seacroft
4	2001.12	屋久島	幼稚園(忘年会)	76	72.4	—	下痢(43%)嘔気(0%)嘔吐(86%) 腹痛(14%)発熱(0%)	7/9		6/6	MX
5	2001.12	川内	職場忘年会	137	61.2	会席料理	下痢(100%)嘔気(67%)嘔吐(83%) 腹痛(50%)発熱(17%)	6/6		6/6	
6	2001.12	鹿屋	職場忘年会	29	74.4	バカガイの酢の物(推定)	下痢(80%)嘔気(100%)嘔吐(80%) 腹痛(80%)発熱(20%)	5/5	5/5	5/5	
7	2001.12	川内	高校サッカー大会	72	75.0	旅館の食事	下痢(71%)嘔気(76%)嘔吐(53%) 腹痛(59%)発熱(59%)	17/19		17/17	
8	2002.1	鹿児島市	結婚披露宴	309	47.2	披露宴の料理	下痢(100%)嘔気(60%)嘔吐(80%) 腹痛(40%)発熱(0%)	5/5		5/5	
9	2002.1	鹿屋	婦人会新年会	8	50.0	新年会の食事	下痢(100%)嘔気(100%)嘔吐(100%) 腹痛(100%)発熱(0%)	1/2	1/1		
10	2002.2	名瀬	小中学校剣道大会	43	—	—	下痢(60%)嘔気(40%)嘔吐(60%) 腹痛(90%)発熱(30%)	10/13		10/10	

\* 発熱は38.0を計上

表3 患者検体中のNV量 (copy/g)

事例	検体番号	検体	G1	G2
			copy / g	copy / g
1	徳之島2	糞便	$1.1 \times 10^6$	0
	徳之島3	糞便	$2.7 \times 10^7$	0
2	加治木2	糞便	0	$1.3 \times 10^8$
	加治木3	糞便	0	$9.6 \times 10^3$
3	出水7	糞便	0	$9.0 \times 10^8$
	出水8	糞便	0	$2.9 \times 10^8$
4	屋久島1	吐物	0	$1.5 \times 10^8$
	屋久島3	吐物	0	$6.4 \times 10^8$
	屋久島6	糞便	0	$4.6 \times 10^9$
	屋久島7	糞便	0	$2.0 \times 10^9$
	屋久島8	糞便	0	$1.3 \times 10^6$
	屋久島9	糞便	0	$2.8 \times 10^7$
5	川内1	糞便	0	$8.6 \times 10^7$
	川内2	糞便	0	$1.1 \times 10^9$
	川内4	糞便	0	$2.4 \times 10^7$
	川内5	糞便	0	$3.9 \times 10^7$
	川内6	糞便	0	$4.6 \times 10^8$
	川内7	糞便	0	$1.1 \times 10^8$
6	鹿屋4	糞便	$1.0 \times 10^9$	$9.0 \times 10^6$
	鹿屋5	糞便	$3.1 \times 10^6$	$1.2 \times 10^9$
	鹿屋6	糞便	$2.3 \times 10^6$	$5.9 \times 10^9$
	鹿屋10	糞便	$5.4 \times 10^6$	$5.2 \times 10^6$
	鹿屋11	糞便	$2.4 \times 10^5$	$4.3 \times 10^8$
7	川内21	糞便	0	$1.9 \times 10^8$
	川内22	糞便	0	$7.0 \times 10^7$
	川内23	糞便	0	$2.2 \times 10^6$
	川内25	糞便	0	$1.7 \times 10^9$
	加治木11	糞便	0	$3.3 \times 10^7$
	加治木12	糞便	0	$2.1 \times 10^8$
	加治木13	糞便	0	$1.4 \times 10^9$
	加治木14	糞便	0	$8.6 \times 10^6$
	志布志1	糞便	0	$2.6 \times 10^9$
	志布志2	糞便	0	$3.5 \times 10^4$
	志布志3	糞便	0	$3.7 \times 10^8$
	志布志4	糞便	0	$7.3 \times 10^7$
	志布志5	糞便	0	$8.3 \times 10^6$
	志布志7	糞便	0	$2.1 \times 10^7$
志布志8	糞便	0	$2.2 \times 10^8$	
志布志9	糞便	0	$2.4 \times 10^7$	
志布志10	吐物	0	$8.0 \times 10^4$	
8	指宿1	糞便	0	$9.2 \times 10^9$
	宮之城1	糞便	0	$1.4 \times 10^7$
	出水11	糞便	0	$3.6 \times 10^9$
	加治木21	糞便	0	$2.6 \times 10^7$
	鹿屋21	糞便	0	$4.4 \times 10^8$
9	鹿屋32	糞便	$1.1 \times 10^6$	0
10	名瀬8	糞便	0	$2.9 \times 10^9$
	名瀬9	糞便	0	$7.2 \times 10^9$
	名瀬10	糞便	0	$5.7 \times 10^9$
	名瀬11	糞便	0	$1.8 \times 10^8$
	名瀬16	糞便	0	$4.6 \times 10^9$
	名瀬17	糞便	0	$4.9 \times 10^9$
	名瀬18	糞便	0	$1.9 \times 10^7$
	名瀬19	糞便	0	$8.9 \times 10^7$
	名瀬21	糞便	0	$1.3 \times 10^8$
	名瀬22	糞便	0	$3.0 \times 10^6$

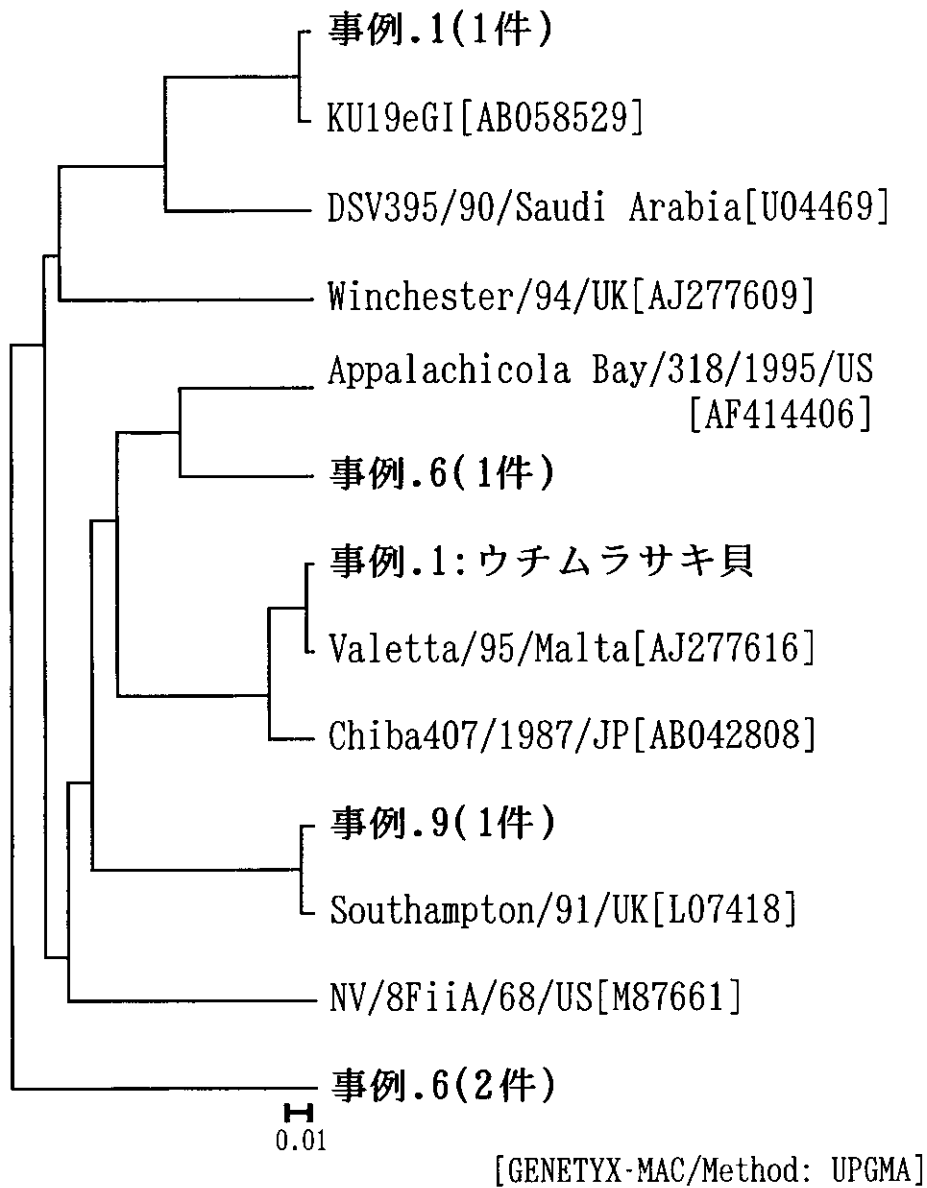


図1 検出されたノーウォークウイルスG1の系統解析

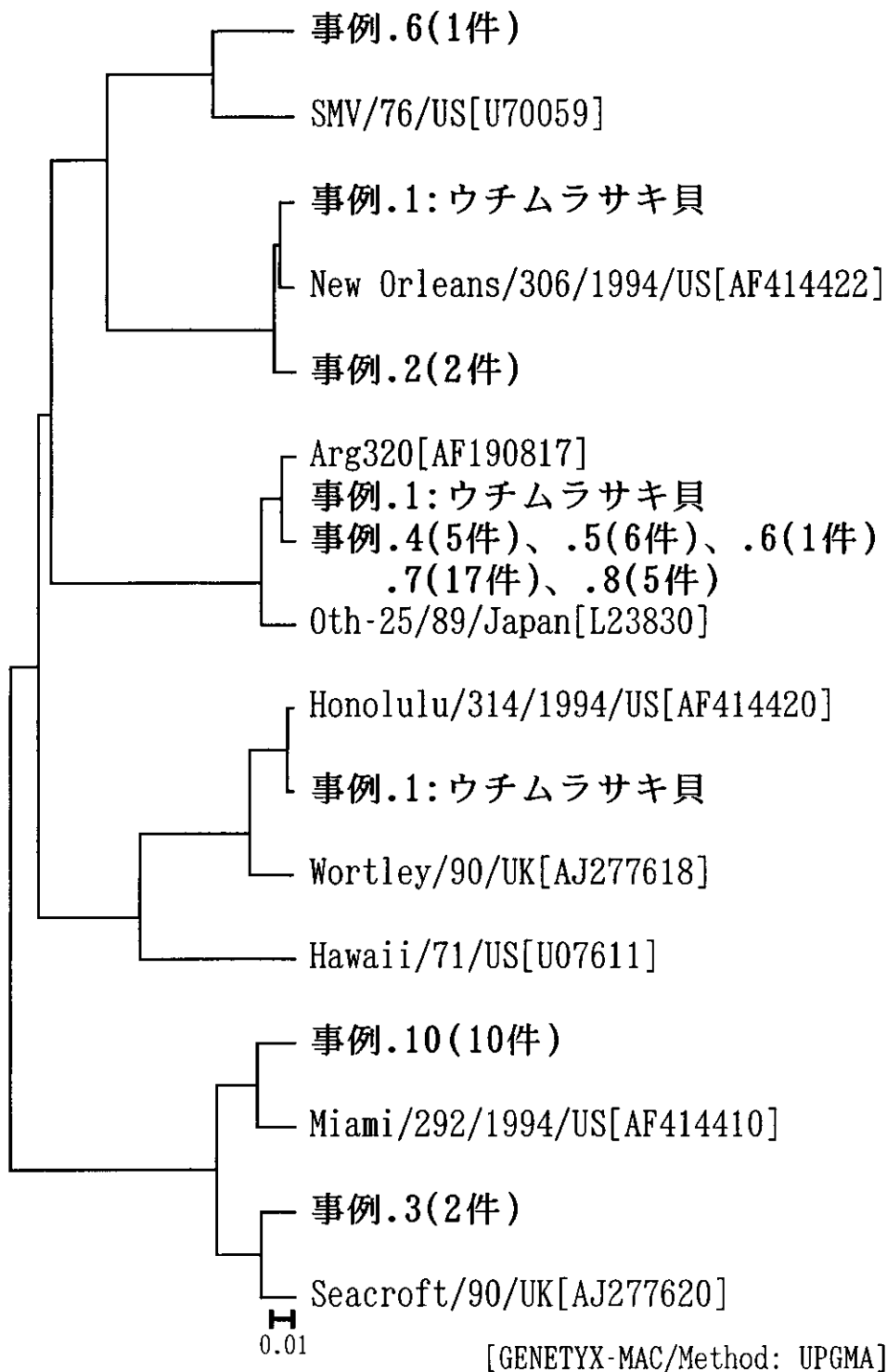


図2 検出されたノーウオークウイルスG2の系統解析

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 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

分担研究者 大瀬戸 光明 愛媛県立衛生環境研究所

## 研究要旨

食品のウイルス学的安全性評価の一環として、輸入食品からリアルタイム PCR、nested RT-PCR を用い、ノーウォークウイルス(NV)、サッポロウイルス(SV)、A 型肝炎ウイルス(HAV)の検出を試みた。その結果、SV と HAV は全く検出されなかったが、NV は赤貝から 2 例（検出率 7.4%）、はまぐりから 1 例(6.7%)検出された。NV 遺伝子の定量値は低く、100 コピー/g 以下であった。また、自家製 Digoxigenin 標識プローブを用いたドットプロットハイブリダイゼーションを検討し、比較的迅速な確認検査が可能になった。

### A. 研究目的

魚介類や果実等生鮮食品を介する A 型肝炎や急性胃腸炎の食中毒事例が多数報告されている。我が国は大量の食品輸入国であるため、健康危機管理対策として輸入食品の安全性の確保は重要な課題である。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する。

また、同時にウイルス検出法についても、検討を行ったので報告する。

### B. 研究方法

#### 1. NV の検出：

NV 遺伝子検出 RT-PCR は、平成 13 年 11 月 16 日付食監第 26 号厚生労働省医薬局食品保健部監視安全課長通知「ノーウォーク様ウ

イルス(NLV)の RT-PCR 法について」で改訂された、新しい検査法を用いた。食品からの RNA 抽出には QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen)を用いた。RT-PCR のプロトコールを図 1 に示した。輸入貝類等食品からの NV 検出には、nested PCR を適用し、1st PCR プライマーは genotype 1(G1)検出用として COG1F と G1SKR を、genotype 2(G2)検出用として COG2F/G2SKF を用い、nested PCR プライマーは G1 には COG1F/COG1R を、G2 には COG2F/COG2R を用いた。なお、食中毒事例の患者及び調理従事者の糞便からの NV 検出は、1st PCR のみとし PCR サイクル数を 40 サイクルとした。いずれの場合も検出陽性の確定には、Digoxigenin(DIG)を標識した RING1 及び RING2 プローブを用い、ドットプロットハイブリダイゼーションによる確認を行った。

#### 2. ドットプロットハイブリダイゼーション

ン：

カスタム合成した RING1 と RING2 プローブを DIG Oligonucleotide 3'-End Labeling Kit (Roche) を用いて、図 2 に示した手順で DIG 標識プローブを作製した。全工程は 3 時間程度で完了する。PCR 産物 1 $\mu$ l をナイロンメンブレンにプロットし、ハイブリダイゼーションは 54 $^{\circ}$ C の振とう恒温槽で、4 時間又は一夜行った。プロットの検出は DIG 発光検出キット (Boehringer Mannheim) を用い、マニュアルに準じた。

### 3. 輸入食品のウイルス検査：

平成 13 年 9 月以降、毎月 10 検体買上した輸入魚介類から、本研究班マニュアルに従いウイルス含有分画を粗精製した。貝類では中腸腺 5g、エビ類では消化管 1g を目安として供試した。粗精製した検体の一部は兵庫県衛生研究所で培養細胞法によるウイルス分離を行った。また、一部はマニュアルに準じて RNA を抽出し、NV の nested RT-PCR を行うと共に、cDNA を国立公衆衛生院に送付した。国立公衆衛生院では、NV、SV、HAV を標的としたリアルタイム PCR で検出ウイルスの定量を行った。

また、貝類からのウイルス検出の対照として、愛媛県産のカキからの NV 検出を nested RT-PCR で行った。

### 4. 愛媛県におけるウイルス性食中毒及び有症苦情の発生状況：

平成 13 年 1 月以降の県内でのウイルス性食中毒事例或いは胃腸炎有症苦情事例の発生時に、その原因追求のためのウイルス検査を実施し、特に原因食品の疑いがある食品については積極的にウイルスの検出を行った。

## C. 研究結果

新しい通知に基づく NV のプライマー群、COG1F/R、COG2F/R と G1SKF/R、G2SKF/R

及びそれらを組み合わせた COG1F/G1SKR、COG2F/G2SKR は、3 組とも RT-PCR でエキストラバンドが出現する。特に、G1 のプライマーではその傾向が強く、PCR 結果の確認にはバンドを切り出してシーケンスするか、適当なプローブを用いたハイブリダイゼーションによる確認が必ず必要であると考えられた。ドットプロットハイブリダイゼーションによる確認法は、検体数が多くても比較的迅速に実施でき、食中毒検査結果の早期還元にも有効である。そこで、すでに RING1、RING2 プローブが公表され高い評価を得ているので、このプローブを用いたドットプロットハイブリダイゼーションの検討を行った。まず、プローブを DIG 標識し力価を測定したところ、5ml のハイブリ液に対し RING2-DIG 標識プローブは 1 $\mu$ l の添加で適当であったが、RING1-DIG 標識プローブは 5 $\mu$ l の添加が必要であった。図 2 のプロトコールに基づいて標識プローブを作製すると、通常 20 回以上ハイブリダイゼーションに用いることができた。また、凍結保存(-20 $^{\circ}$ C)しておき 10 回の凍結融解では明らかな力価の減弱は認められなかった。

図 3 にドットプロットハイブリダイゼーションで検出されたプロットを示した。この事例はカキ関連の食中毒事例であったため、同一人から G1 と G2 の両方の遺伝子が検出される例が多かった。この方法では、PCR 産物 1 $\mu$ l を直接プロットしたが、多くのエキストラバンドが出ていた検体でも非特異的反応は全くみられなかった。今後は今回用いたプローブがハイブリダイズしないウイルス株がどの程度あるのか明らかにしておく必要がある。

平成 13 年 9 月から 14 年 2 月までに毎月 10 検体、計 60 検体の輸入魚介類からのウイルス検出結果を表 1 に示した。赤貝 27 検体、平貝 3 検体、あさり 2 検体は韓国産で、はまぐり

15 検体は中国産と北朝鮮産であった。ブラックタイガーは 13 検体でインド、インドネシア、ベトナム産であった。リアルタイム PCR では、はまぐり 1 例から NV 遺伝子が検出された。遺伝子型はすべて G2 であった。HAV 及び SV は全例陰性であった。一方 nested PCR では赤貝 2 例が陽性で、遺伝子型は G2 であった。

次に、平成 13 年 12 月から 14 年 2 月までの間、県内のカキ養殖地で毎月 2 回、5 検体ずつ採取し、NV の RT-PCR を実施し、結果を表 2 に示した。カキからは 12 月に 1/10 例、1 月に 3/10 例が NV 陽性であったが、2 月はすべて陰性であった。

表 3 には、後述する食中毒に関連するカキからの NV 検出例を含め、貝類からの NV 検出例をまとめた。輸入貝類からはリアルタイム PCR で 1 例陽性と判定され、遺伝子コピー数は北朝鮮産はまぐり 96.87 コピー/g と算定された。nested RT-PCR では 2 例陽性であったが、リアルタイム PCR では陰性であった。カキからはリアルタイム PCR で 3 例陽性になり、そのうち 2 例は食中毒の原因となったカキで、G2 遺伝子がそれぞれ 6141 コピー/g、2628 コピー/g と算定された。同時に G1 遺伝子も検出されたが、コピー数はそれぞれ 81 コピー/g、305 コピー/g と少量であった。その他の 6 例は、nested PCR では陽性であったが、リアルタイム PCR では陰性と判定された。この結果が不一致であった原因は、両方の検査法で用いたプライマーが必ずしも同じでなかったこともあるが、両者の検出限界値が異なり、且つ不安定であったためと思われる。

表 4 には、平成 13 年 1 月以降に取り扱った NV による食中毒及び有症苦情事例の概要とウイルス検査結果を示した。事例 3 と 6 は疫学的調査で原因施設が明らかにできず、有症苦情事例とされ、事例 5 は他県での食事が原因で患者の検査のみ行った事例であった。

これらの事例を含めた 7 例のうち、5 例は食材にカキが含まれカキが関与していたことが強く示唆された。他の 2 例は NV に 1 次汚染していたと推察される食材は使われておらず、調理中の 2 次汚染が原因と考えられた。なお、検査した調理従業員の便及び弁当の 10 品目からは全く NV は検出されなかった。

事例 1 の原因と推定されたカキ、及び事例 2 の原因カキと同産地のカキからは nested RT-PCR で NV が検出された。事例 1 の NV 陽性患者 9 名からは、Ando らのプローブ型が 2~3 種類同時に検出された例が多く、グループ全体では 4 種類 (P2A、P1A、P2B、P1B) 全ての型が検出された。また、リアルタイム PCR でも比較的大量のコピー数 (表 3) が検出された。原因のカキは小村落の生活廃水が流入している湾内の海岸付近で採取されていたので、湾内、湾外に 4 箇所の定点を設けて 1 月から 3 月までカキの NV 汚染状況を調査した。しかし、NV はその後全く検出されず、NV によるカキの汚染程度は、採取時期、カキの生育場所により著しく異なる可能性が示唆された。

事例 7 はカキの入った赤だしによる食中毒と断定され、カキの加熱不足が原因と推測された。カキの摂食量は 1 人 1 個ずつで、202 人中 58 名 (28.7%) が発症した。急性胃腸炎の発症にはカキは 1 個で十分であることが再確認された。

平成 13 年 11 月以降に発生した食中毒の検査には、通知で新たに推奨されたプライマー、プローブを用いた。プライマー別の NV 検出状況を表 5 に示した。COG1F/R と COG2F/R を用いる系、G1SHF/R と G2SKF/R を用いる系、G1SKR/COG1F と G2SKR/COG2F の組み合わせを用いる系等を試みたが、どの系でも同じ結果を得た。RING プローブによる確認検査ができ、必要なら PCR 産物からシー



クエンズ解析が可能な G1SKR/COG1F と G2SKR/COG2F プライマーを用いる系が最も適していると考えられた。また、これらのプライマーは電子顕微鏡法 (EM) で陽性例を全て 1st PCR で検出し、従来の Yuri 系、NV 系、あるいは G1/G2 系プライマーを用いた nested PCR と同程度の感度を有していると考えられた。

#### D. 考察

食品、特に魚介類のウイルス学的安全性を評価し、安全性の基準を定める必要性が高まっている。食品の安全性を判断するためには、食品から直接病原ウイルスを検出し、さらには汚染量を定量することが最も確実な方法である。それには高感度で再現性の高いウイルス検出法が必要とされる。最近新しいプライマー、プローブを用いた NV 検出リアルタイム PCR が開発され、高い評価を得ている。

今回、輸入魚介類のウイルスによる汚染状況を把握するため、国立公衆衛生院を中心とした地方衛生研究所等との業務分担体制を組織し、NV、HAV、SV 等の定量的検出のためリアルタイム PCR を実施した。結果は予想よりウイルス汚染の頻度、濃度とも軽微であった。また、リアルタイム PCR の 1 反応系あたり 10 コピー以下での検出例は、RT-PCR の陽性例と相関がなかった。リアルタイム PCR、RT-PCR とも、それぞれの検出限界、検出可能なウイルス株の範囲等を明確に示し、今後とも継続的にプライマー、プローブの有効性を評価し、ウイルスの変異に適切に対応できるよう改良を続けていく必要があると思われた。

そのためには、食中毒起因株や地域での散发性流行株のシークエンズ解析情報を、一元化して、計画的組織的に収集、解析、還元する体制確立が望まれる。また、プライマー、プローブの有効性の評価には、EM による NV

や SV の検出結果と PCR によるそれらの遺伝子検出結果を常に比較しておくことが有用であろう。

さらなる高感度のウイルス検出には、食品からのウイルス粒子の精製、濃縮法や、ウイルス RNA 抽出法の段階が大きく影響すると考えられる。これらの方法の改良には、リアルタイム PCR を用い定量的に前処理法を検討することにより、最も効率の良い方法が開発されることが期待される。

#### E. 結論

輸入食品のウイルス汚染状況を把握するため、リアルタイム PCR (NV、HAV、SV) 及び nested RT-PCR(NV)を行い、赤貝から 2 例(検出率 7.4%)、はまぐりから 1 例(6.7%)が NV 遺伝子陽性であった。リアルタイム PCR による検出 NV 遺伝子の定量値は低く、100 コピー/g 以下であった。

県内産カキからは RT-PCR で NV が 4 例(検出率 13.3%) 検出された。

平成 13 年 1 月以降、7 事例の食中毒及び有症苦情事例から NV が検出され、原因物質と推定された。そのうち 5 事例にカキの摂食が関与していた。

カキを 1 個ずつ摂食したグループの発症率は 28.7% (58 人/202 人中) であった。

#### F. 研究発表

##### 1.論文発表

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

## 2.学会発表

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发例における **Sapporo virus** の役割. 第 49 回日本ウイルス学会、大阪市、2001、11 月.

左近直美、大瀬戸光明、山崎謙治、大石功、奥野良信：Human astrovirus (HastV) のエピソード解析. 第 49 回日本ウイルス学会、大阪市、2001、11 月.

## G. 知的所有権の出願・登録状況

なし

1. Sample RNA

2.Dnase I treatment	1 tube	x	tubes	
5X RT buffer	3.0 ul	x	=	ul
5u./ul Dnase I	0.2 ul	x	=	ul
RNase Inh.(70u/ul)	0.3 ul	x	=	ul
	3.5 ul			ul
Sample RNA			dispense	3.5ul/tube 10ul/tube 13.5ul
Thermal Cycler			37°C	30min
Program no.			75°C	5min
			4°C	hold

3.Reverse Transcription

Add	RT-mix	1 tube	x	tubes	
	RT-mix	1.0 ul	x	=	ul
	DW	2.0 ul	x	=	ul
	5X RT buffer	4.0 ul	x	=	ul
	dNTPmix(2.5mM)	1.2 ul	x	=	ul
	100mM DTT	1.0 ul	x	=	ul
	500ug/ml oligo dT	1.0 ul	x	=	ul
	Random primer(9mer)	0.3 ul	x	=	ul
	RNase Inh.(70u/ul)	1.0 ul	x	=	ul
	Super Script II-RT	11.5 ul			ul
Thermal Cycler			42°C	60min	
Program no.			99°C	5min	
			4°C	hold	

4.PCR

PCR-mix	1 tube	G1	( )tubes	G2	( )tubes
DW	34.75 ul	"	ul	"	ul
10X Ex buffer	5.00 ul	"	ul	"	ul
dNTPmix(2.5mM)	4.00 ul	"	ul	"	ul
Forward-primer(50uM)	0.50 ul		ul		ul
Reverse-primer(50uM)	0.50 ul		ul		ul
Ex Taq. Polymerase	0.25 ul	"	ul	"	ul
	45.00 ul		ul		ul
Template	5.00 ul		5 ul		5 ul
Thermal Cycler		95°C	3min	} 30 cycles	
Program no.		95°C	30sec		
		52°C	30sec		
		72°C	60sec		
		72°C	7min		
		4°C	hold		

5.nested PCR

PCR-mix	1 tube	G1	( )tubes	G2	( )tubes
DW	38.75 ul	"	ul	"	ul
10X Ex buffer	5.00 ul	"	ul	"	ul
dNTPmix(2.5mM)	4.00 ul	"	ul	"	ul
Forward-primer	0.50 ul		ul		ul
Reverse-primer	0.50 ul		ul		ul
Ex Taq. Polymerase	0.25 ul	"	ul	"	ul
	49.00		ul		ul
Template	1.00		1		1
Thermal Cycler		95°C	3min	} 30 cycles	
Program no.		95°C	30sec		
		52°C	30sec		
		72°C	60sec		
		72°C	7min		
		4°C	hold		

図1 食品のNV検出RT-PCRのプロトコール

## DIG Oligonucleotide 3'-end Labeling

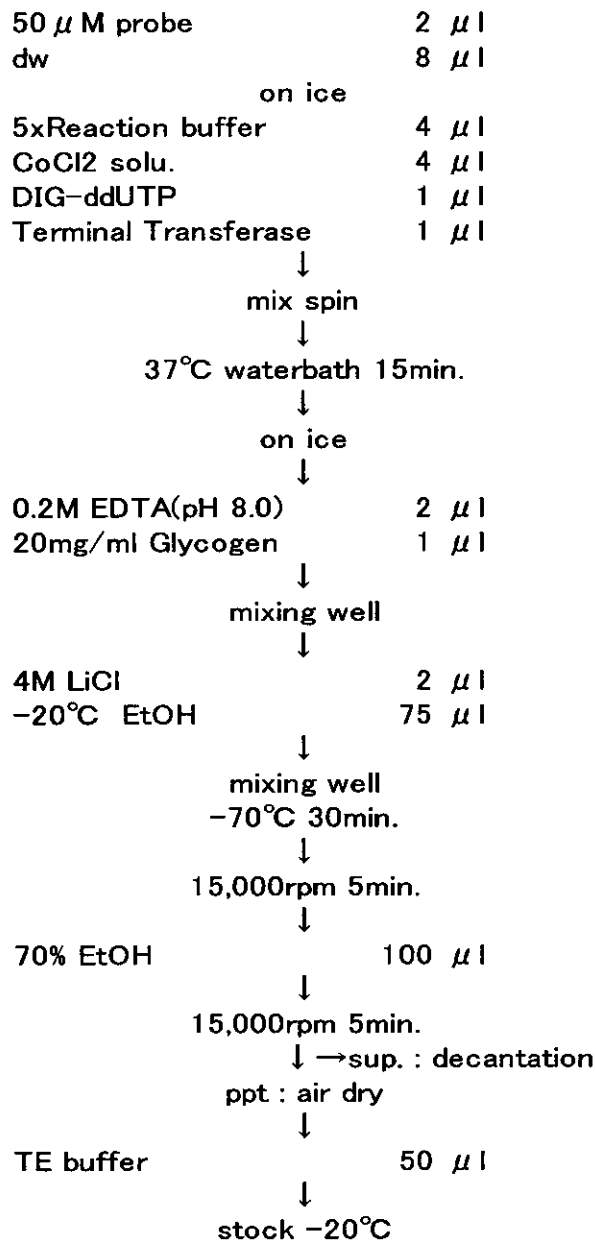


図2 Oligonucleotide プローブのDIG標識プロトコール

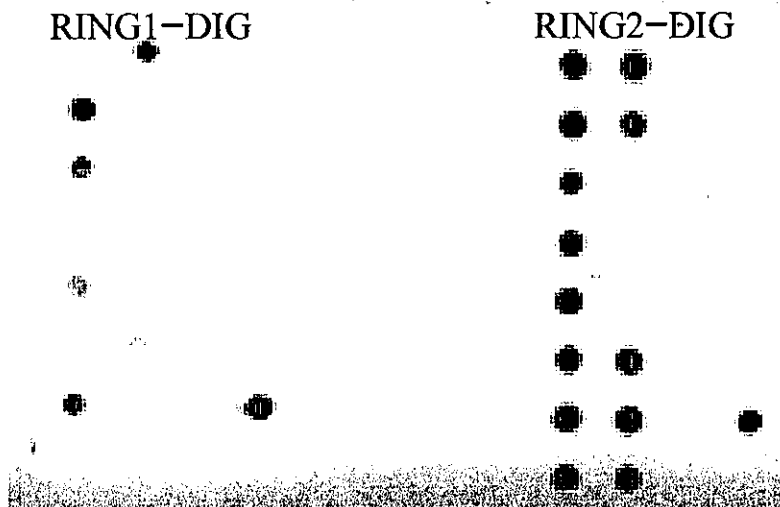


図3 ドットブロットハイブリダイゼーションによるプローブ型別

表1 輸入食品からのウイルス検出状況

品名	産地	検査数	Hepatitis A virus	Norwalk virus				Sapporo virus
			Real Time PCR	Real Time PCR		nested RT-PCR		Real Time PCR
				G1	G2	G1	G2	
赤貝	韓国	27	0	0	0	0	2	0
平貝	韓国	3	0	0	0	0	0	0
はまぐり	中国	14	0	0	0	0	0	0
	北朝鮮	1	0	0	1	0	0	0
あさり	韓国	2	0	0	0	0	0	0
ブラックタイガー	インド	7	0	0	0	0	0	0
	インドネシア	5	0	0	0	0	0	0
	ベトナム	1	0	0	0	0	0	0
計		60	0	0	1	0	2	0

表2 県内産カキのNorwalk virus 検査結果

採取月日	検体数	RT-PCR陽性数		
		RNA抽出したカキ個体数		
		1個	3個	5個
12月14日	5	nt	0	0
12月25日	5	nt	0	1
1月10日	5	1	nt	2
1月24日	5	1	nt	1
2月7日	5	0	nt	nt
2月21日	5	0	nt	nt

表3 食品からのNorwalk virus検出例

品名	産地又は由来等	Real Time PCR		nested RT-PCR		プライマー
		G1	G2	G1	G2	
赤貝	韓国産、9月8日買上	-	-	-	+	SKF/R
はまぐり	中国産、11月5日買上	-	-	-	-	
はまぐり	北朝鮮産、11月13日買上	-	96.87	-	-	
赤貝	韓国産、1月25日買上	-	-	-	+	COF/R
カキ	県内産1月10日採取(5個)	-	-	-	+	COF/R
カキ	県内産、1月10日採取(5個プール)	-	-	-	+	COF/R
カキ	県内産、1月10日採取(5個)	-	-	-	+	COF/R
カキ	県内産、1月24日採取(1個)	-	-	-	+	COF/R
カキ	県内産、1月24日採取(5個)	-	-	-	+	COF/R
カキ	食中毒原因食品、ISOGEN RNA抽出	81.35	6140.82	+	+	Yuri22F/R
カキ	食中毒原因食品、High Pure RNA抽出	305.45	2628.13	+	+	Yuri22F/R
カキ	食中毒原因カキと同産地(2個)加熱用	-	-	-	+	NV81,82/SM82
カキ	食中毒原因カキと同産地(2個)加熱用	-	118.80	-	+	NV81,82/SM82

表4 NVによる食中毒及び有症苦情事例(平成13年1月-14年2月)

発生場所	発生時期	摂食者数	患者数	原因食品	検査材料	数	EM法	RT-PCR
							陽性数	陽性数
1 飲食店	H13.1.12	19	16	酢かき	患者糞便	11	8	9
					従業員糞便	3	1	2
					かき	1	nt	1
2 飲食店	H13.2.4	14	6	かき会席	患者糞便	2	1	2
					患者吐物	1	0	0
					従業員糞便	2	0	0
					かき	2	nt	1
3 その他の施設	H13.12.3	31	15	仕出料理	患者糞便	5	3	5
					従業員糞便	16	0	0
4 合宿	H13.12.25	189	57	仕出弁当	患者糞便	10	3	6
					S高患者糞便	8	1	1
					従業員糞便	4	0	0
					弁当	10	nt	0
5 研修旅行	H14.1.19	105	13?	(かきなべ)	患者糞便	9	5	7
6 飲食店	H14.1.28	3	3	酢かき	患者糞便	3	2	3
					従業員糞便	17	0	0
7 病院	H14.2.1	202	58	かき赤だし	患者糞便	21	8/15	17
					患者吐物	3	0	2

表5 食中毒及び有症苦情事例のRT-PCR結果

事例番号	発生年月日	EM	G1SKR /COF	G2SKR /COF	COG1F/R	COG2F/R	G1SKF/R	G2SKF/R	RING Probe
3	13.12.3	3/5			0/5	5/5	0/5	5/5	RING2
4	13.12.25	4/17			0/17	7/17	0/17	7/17	RING2
5	14.1.19	5/7			0/9	7/9	0/9	7/9	RING2
6	14.1.28	2/3	1/3	3/3					RING1 RING2
7	14.2.1	8/18	7/24	17/24	2/14	7/14			RING1 RING2

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 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

分担研究者 杉枝正明（静岡県環境衛生科学研究所、微生物部）

協力研究者 佐原啓二（静岡県環境衛生科学研究所、微生物部）

稲吉 恵（静岡県環境衛生科学研究所、微生物部）

研究要旨

2001年に静岡県内で発生した急性胃腸炎事例（非細菌性食中毒事例などの集団発生事例）の糞便材料から RT-PCR 法によるウイルスの検出を試み、検出されたウイルス遺伝子の遺伝子解析を行った。その結果、食中毒事例などから NLV s 遺伝子の Genogroup I 型、II 型に属する遺伝子型(Southampton/91/UK、SMV/76/US、Hawaii/71/US)に類似する遺伝子が検出され、これらによる感染が確認された。輸入食品は、60 検体中、NLV s 遺伝子がリアルタイム PCR により 11 検体(18.0%)、RT-PCR で 17 検体(28.0%)から検出された。Sapporo virus は、リアルタイム PCR により 1 検体(1.7%)から検出された。

A.研究目的

生ガキなどの食品を介して冬季に発生する食中毒事件の多くが小型球形ウイルス（SRSV）に起因している。しかし、ウイルス性食中毒と原因食品との因果関係、食中毒発生のメカニズムなどについては不明な点が多く、事例発生後の追及、広域なモニタリング調査による解明が期待されている。

今回、2001年に静岡県内で発生した急性胃腸炎事例（非細菌性食中毒事例などの集団発生事例）について、原因食品の追求と共に諸外国から冷蔵、冷凍状態で輸入されている魚介類を対象に、RT-PCR 法によるウイルス遺伝子の検出を行い、検出したウイルス遺伝子の解析およびリアルタイム PCR を用いた遺伝子検出およびウイルス量（コピー数）を明らかにすることを目的とした。

B.研究方法

2001年1月から12月の期間に、静岡県内で発生した食中毒様集団発生(有症苦情を除く)5事例の患者糞便79件、調理従事者糞便29件、原因食品(推定食品)35件および2001年12月から2002年3月の期間にカキ養殖海域で採取したプランクトン20件を検査対象とした。

輸入魚介類は、2001年9月から2002年2月の期間に千葉市内に輸入され、千葉市食品衛生検査所で購入したハマグリ25件、赤貝23件、ブラックタイガー6件、タイラガイ4件、カキ、ムール貝の各1件、計60件の腸内容物を検査対象とした。

検査材料の前処理、RNA抽出は、本研究班のマニュアルに従い実施した。

NLV s 遺伝子の検出に使用したプライマー

はキャプシド領域を増幅する G I-SKF/SKR、G II-SKF/SKR を用い RT-PCR を行った。

NLV s 遺伝子の解析およびリアルタイム PCR による検出は、国立公衆衛生院（西尾治、主任研究者）に依頼した。

### C. 研究結果

#### 1. NLV s による集団急性胃腸炎事例

2001年1月から12月の期間に、静岡県内で発生した食中毒事例は16事例確認されているが、そのうち6事例(37.5%)がNLV s により発生し、病因物質別の内訳で第一位を占めた。また、食中毒事件と断定できなかった非細菌性集団急性胃腸炎3事例中2事例がNLV s を病因物質別として発生していた(表1)。

表1 NLV s による集団急性胃腸炎事例

事例	事例数	1	2	3・5・11	12/月
食中毒	6		1	1	1 2
食中毒以外	3			1	2

#### 1. 集団急性胃腸炎事例におけるNLV s 遺伝子の検出状況

食中毒6事例のうち、4事例が政令市（静岡市、浜松市）で確認されたもので、2事例の患者、調理従事者糞便および原因食品（加熱調理用カキ）を対象に、RT-PCR 法によるNLV s 遺伝子の検出を試みた。

食中毒2事例の患者20検体中12検体(60%)からNLV s 遺伝子が検出された。また、食中毒以外の小学校、幼稚園で集団発生した患者糞便37検体中35検体(94.6%)からNLV s 遺伝子が検出された(表2)。

表2 集団急性胃腸炎からのNLV s 遺伝子の検出状況

事例	施設	検体数	患者	調理者	食品
食中毒	飲食店	11	3/5	0/5	1/1
〃	修学旅行	15	9/15	0	0
食中毒以外	小学校 (33)	(33)	(10/16)	(0/6)	(0/9)
〃	小学校	68	23/25	0/18	0/25
〃	幼稚園	12	12/12	0	0

陽性数/患者数、( )内はA群ロタウイルス事例

#### 3. カキを養殖する海域でのプランクトンからのNLV s 遺伝子の検出

食中毒事例の原因食品として提供された加熱調理用カキは、本県の汽水湖で養殖されたものでNLV s 汚染を把握する目的で、食中毒事例が発生した同月から養殖海域の5定点のプランクトンを毎月一回採取した。

NLV s 遺伝子は事例が確認された同時期に採取した5定点中4定点から、患者および加熱調理用カキから検出した遺伝子と同じGenogroup I型が検出された(表3)。

表3 プランクトンからのNLV s 遺伝子の検出状況

検査定点	12	1	2	3/月
養殖海域1	+	-	-	-
〃 2	+	-	-	-
〃 3	+	-	-	-
〃 4	+	-	-	-
〃 5	-	-	-	-

#### 4. 輸入食品（魚介類）の検査状況

東南アジア6カ国で生産されたハマグリ、赤貝、ブラックタイガー、タイラガイ、カキ、ムール貝などの魚介類(6種類)からのウイル



ス遺伝子 (NLVs、HAV、Sa) の検出を試みた。

冷蔵および冷凍の状態で購入された60検体中、NLV s 遺伝子がリアルタイム PCR により11検体(18.0%)、RT-PCR で17検体(28.0%)から検出された。Sapporo virus は、リアルタイム PCR により1検体(1.7%)から検出されたが、RT-PCR では検出されなかった。また、HAV はリアルタイム PCR、RT-PCR では検出されなかった。

食品別のウイルス汚染状況をみると、ハマグリ25検体中11検体(44.0%)、ブラックタイガー6検体中2検体(33.3%)、タイラガイ4検体中1検体(25.0%)、赤貝23検体中4検体(17.4%)であった(表4)。また、これらの食品中でハマグリの1検体からは、NLV s、Sapporo 遺伝子による2種類のウイルス汚染が確認されると共に NLV s 遺伝子の Genogroup I、II型の混在も1検体中にリアルタイム PCR により検出された。

表4 輸入食品の検査状況

国名	種類	検体数	NLV s				Sapporo virus		HAV	
			Real time		RT-PCR		Real time	RT-PCR	Real time	RT-PCR
			GI	GII	GI	GII				
中国	赤貝	14	0	0	0	2	0	0	0	0
	ハマグリ	14	0	1	1	4	0	0	0	0
	カキ	1	0	0	0	0	0	0	0	0
韓国	赤貝	8	1	0	2	0	0	0	0	0
	タイラガイ	4	0	1	0	0	0	0	0	0
	ハマグリ	1	0	1	0	1	0	0	0	0
	ムールガ貝	1	0	0	0	0	0	0	0	0
北朝鮮	ハマグリ	10	2	4	2	4	1	0	0	0
	赤貝	1	0	0	0	0	0	0	0	0
インドネシア	BT	4	0	2	0	2	0	0	0	0
マレーシア	BT	1	0	0	0	0	0	0	0	0
インド	BT	1	0	0	0	0	0	0	0	0
計		60	3	9	5	13	1	0	0	0

#### 5. 静岡県内で検出された NLV s の遺伝子型

2001年1月から12月の期間に、静岡県内で確認したNLV s 遺伝子型は、食中毒事例の患者糞便、原因食品(加熱調理用カキ)から Southampton/91/UK、Southampton/91/UK の類似株、食中毒以外の小学校、幼稚園で集団発生した事例の患者糞便から Hawaii/71/US 類似株が検出された。

食品では国内産の生食用カキから、Genogroup I、II型が検出され、輸入魚介類からは、Genogroup I型がハマグリ3検体、赤貝2検体から、Genogroup II型がハマグリ4検体、赤貝3検体、ブラックタイガー2検体、タイラガイ1検体から、Genogroup I、II型の混在は、ハマグリ2検体中から検出された(表5)。

表5 静岡県内で検出されたNLV sの遺伝子型

由来	Southampton /91/UK	SMV/76/ /US	Hawaii/ 71/US	Genogroup		Genogroup I型+II型
				I型	II型	
食中毒	1事例	1事例				
食中毒以外			2事例			
生食用カキ(国産)				1	1	
輸入魚介類						
(ハマグリ)				3	4	2
(赤貝)				2	3	
(ブラックタイガー)					2	
(タイラガイ)					1	

6. リアルタイムPCRにより検出された食品中のウイルス遺伝子のコピー数  
輸入魚介類、カキ(生食用国内産)およびプランクトン中におけるウイルス遺伝子のコピー数は表6に示した。

表6 食品中のウイルス遺伝子のコピー数

由来	検査数	コピー数		
		Genogroup I型	Genogroup II型	Sapporo
ハマグリ	10	50	32	132
		73	55	
			100	
			114	
			167	
赤貝	3	34	22	
ブラックタイガー	2	2936		
			11603	
養殖カキ	2	211	63	
タイラガイ	1		34	
プランクトン	1		177	

#### D. 考察

食品衛生法が改正され4年が経過した。この間、静岡県内で発生した食中毒事例でNLV sが原因で発生した事例は全食中毒事例の約30%を占め、病因物質の第一位であることが確認されている。

これらのNLV s食中毒の原因食品として、生ガキの汚染実態を実施し、感染源として十分注意していく必要性を報告してきたが、生ガキの関連しない事例も約半数以上を占めていることから生ガキ以外の食品中のウイルス汚染の実態を把握することが重要である。

今回、2001年静岡県内で発生したNLV sによる食中毒事例は全食中毒の16事例中6事例(37.5%)を占め、病因物質の内訳で第一位にランクされた。6事例のうち、4事例が政令市(静岡市、浜松市)で確認されたもので、2事例のうち、2001年12月に料理点のカキ鍋を摂食し、発

症した事例の検索をした。カキ鍋の材料として使用されていたカキは、本県の汽水湖で養殖され、加熱調理用カキとして県内で消費されているもので、患者から検出されたNLV s 遺伝子と同一の遺伝子型 (Southampton/91/UK) を確認した。同時期、他の飲食店などでも同じカキを使用しているが、患者発生は報告はされず、加熱温度が不十分な状態で摂食したことが原因と思われる。

上記事例の発生した養殖海域でのNLV s 汚染を把握する目的で、養殖海域5定点のプランクトンを採取したところ、患者、養殖カキから検出した同一の遺伝子型が確認された。検出された時期の海水中のプランクトンは植物性が殆んどを占めており、他の時期(1月～3月)にはこのプランクトンの存在、NLV s の確認はできなかつたが、カキ養殖の海域汚染をサーベイランスする一手法として、継続した調査を実施し、行政指導の指標作成資料となるよう調査していきたい。

わが国には諸外国から魚介類が大量に輸入されていることから、ウイルスなどの微生物の汚染搬入が考えられる。

今回、東南アジアの6カ国で生産された魚介類6種類からのウイルス汚染を調査した。6種類中4種類(ハマグリ、赤貝、ブラックタイガー、タイラガイ)にウイルス汚染が確認された。これらの食品は調理の手軽さから、単品、複合食品の素材として多方面の飲食関係で消費されている。生ガキを使用しない集団給食施設(学校給食、仕出し弁当)などでは、これまでにNLV s による大規模な集団事

例が発生しているが、原因食品を断定するまでに至っていない事例も多く、輸入食品のウイルス汚染にも十分注意していく必要がある。また、リアルタイムPCRにより検出された食品中のウイルス遺伝子のコピー数は32～11603個で、ウイルスが食品中の腸管に蓄積したままで流通し、ウイルス感染が成立しているものと思われる。

輸入食品は季節に左右されることなく流通しており、これらの食品による汚染拡大も示唆されることから、ウイルス学的安全性を確保するために、流通過程における検査体制の強化、情報提供が重要とおもわれる。

## E. 結論

輸入食品は、60検体中18検体(30%)からNLV s 検出された。NLV s 陽性は中国産アカガイ、ハマグリ、韓国産アカガイ、タイラガイ、ハマグリ、北朝鮮産ハマグリおよびインドネシア産ブラックタイガー(エビ)であった。サッポロウイルスは北朝鮮産ハマグリ1検体から検出された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

杉枝正明、佐原啓二、長岡宏美、三輪好伸、秋山真人：小型球形ウイルス(SRSV)による食中毒防止対策に関する研究、静岡県環境衛生科学研究所報告、1999

## 2. 学会発表

杉枝正明、中島節子：ブタから検出した Norwalk-like virusi 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，大阪，2001