

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

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 古屋 由美子 神奈川県衛生研究所

研究要旨

検査した輸入生鮮食品は70件中4件がノーウォークウイルスに汚染されていることが明らかになった。ノーウォークウイルスが検出されたのは、中国産アカガイ、カキ、韓国産タイラガイ、北朝鮮産ハマグリであった。サッポロウイルス、A型肝炎ウイルスは全て陰性であった。発生した食中毒はすべてノーウォークウイルスが原因であることが示された。

A. 研究目的

病原体汚染の危険性の高い輸入食品についてウイルス汚染状況を調べ、安全性の評価を行うための基礎データを蓄積するとともに、食品を介すると推定される患者発生時に患者からの病原体の検出を行い、感染経路を明らかにし、感染拡大の阻止に努めることを目的とした。

B. 研究方法

1) 輸入食品検査

平成13年8月から平成14年2月まで毎月10検体ずつ合計70検体の中国、韓国および北朝鮮からのニ枚貝65件、およびインドネシア、フィリピンおよびミャンマーからのエビ類5件、計70件についてニ枚貝は中腸線、エビ類は背腸を取り出し、超遠心でウイルス濃縮を行った。ウイルス濃縮液500 μ lのう

ち140 μ lからRNAを抽出した後、cDNAを作製し、A型肝炎ウイルス、ノーウォークウイルス、サッポロウイルスについてReal time PCRを行った。

2) 食中毒発生事例

2001年1月から2002年2月までに神奈川県内で発生した食中毒9事例について、患者および原因食品についてRNAを抽出した後、cDNAを作製し、RT-PCRを行った。

C. 研究結果

1) 輸入食品検査

(1) 月別検出状況（表1）

検査した70検体中、10月の中国産アカガイ1検体（NVのG1で821コピー/中腸腺1g）、2月の中国産カキフライ（G1で115コピー/g）、韓国産タイラガイ1検体（G2で4,292コピー/g）および北朝鮮産ハマ

グリ1件(G2で211コピー/g)、合計4検体(17.5%)からNVが検出された。しかしA型肝炎ウイルス、サッポロウイルスは検出されなかった。

(2) 国別検出状況(表2)

国別では中国の33件中2件(6.1%)、韓国産は16件中1件(6.3%)および北朝鮮産12件中1件(8.3%)からNVが検出された。しかしインドネシア、フィリピンおよびミャンマーからのエビ類9件からウイルスは検出されなかった。

2) 食中毒発生事例(表3、4)

平成13年1月から平成14年2月の間に神奈川県内で9事例の集団発生が見られた。

原因食材はカキが5件、アサリおよび甘エビが1件、帆立稚貝、イカ塩辛および不明が各1件であった。全ての集団発生の患者からNVが検出された。また従事者のふん便からは2事例からノーウォークウイルスが見出され、他の5事例は陰性であった。食材は4事例から得られたが、実際に料理として出されたものと同一のものは既に消費されていたので、事例No.7と8はカキの別ロットのものについて検査を行ったところ、イカの塩辛以外は全て陰性であった。

従って、9事例は患者および摂食食品からノーウォークウイルスが検出され、ノーウォークウイルスによる食中毒であることが示された。

D. 考察

輸入生鮮食品は5.7%がノーウォークウイルス

に汚染されていることから、これら汚染された食品による食中毒の発生の危険があると考えられた。

2001年4月に発生した食中毒事例で、患者からノーウォークウイルスが検出され、飲食店で作った塩辛からもノーウォークウイルスが検出され、原因食品は自家製塩辛であることを特定した。この塩辛はイカの凍結融解などの塩辛作製過程に汚染されたと考えられたので、既に販売された塩辛は回収を行い、感染の拡大防止に努めた。

他の食中毒8事例中5事例は聞き取り調査でカキを摂食した事例あったが、摂食した食材で残っていたものは1事例のみあった。感染経路の解明のためにも食材を検査するために料理店等では食材を確保しておくようにすることが必要であると考えられた。

E. まとめ

輸入生鮮食品についてウイルスによる汚染状況を調べたところ、ノーウォークウイルスに汚染されているもののあることが示され、これらの取り扱いには注意する必要があると思われた。

食中毒事例では感染経路の解明のためにも食材を確保する必要があると考えられた。

表1 輸入食品月別汚染状況（神奈川県）

月	国名	種類	検体数	リアルタイム PCR			
				NV		HAV	Sa
				G1	G2		
8月	中国	アカガイ	4	0	0	0	0
		ハマグリ	5	0	0	0	0
	北朝鮮	アカガイ	1	0	0	0	0
9月	中国	アカガイ	2	0	0	0	0
		ハマグリ	3	0	0	0	0
	韓国	アカガイ	2	0	0	0	0
	北朝鮮	アカガイ	1	0	0	0	0
	アメリカ	カキ	2	0	0	0	0
10月	中国	アカガイ	2	821	0	0	0
		ハマグリ	5	0	0	0	0
	北朝鮮	ハマグリ	1	0	0	0	0
	アメリカ	カキ	2	0	0	0	0
11月	中国	アカガイ	1	0	0	0	0
		ハマグリ	2	0	0	0	0
	韓国	アカガイ	2	0	0	0	0
	北朝鮮	ハマグリ	2	0	0	0	0
	インドネシア	ブラックタイガー	1	0	0	0	0
	フィリピン	ブラックタイガー	1	0	0	0	0
ミャンマー	ブラックタイガー	1	0	0	0	0	
12月	中国	アカガイ	2	0	0	0	0
		ハマグリ	2	0	0	0	0
	韓国	アカガイ	2	0	0	0	0
		ムールガイ	1	0	0	0	0
	北朝鮮	ハマグリ	2	0	0	0	0
	インドネシア	ブラックタイガー	1	0	0	0	0
1月	中国	アカガイ	2	0	0	0	0
		ハマグリ	2	0	0	0	0
	韓国	アカガイ	3	0	0	0	0
		タイラガイ	1	0	0	0	0
	北朝鮮	ハマグリ	2	0	0	0	0
2月	中国	カキフライ	1	115	0	0	0
	韓国	アカガイ	3	0	0	0	0

		タイラガイ	2	0	4292	0	0
	北朝鮮	ハマグリ	3	0	211	0	0
	インドネシア	キングエビ	1	0	0	0	0
計			70	2	2	0	0

表2 輸入食品国別汚染状況（神奈川）

国名	種類	検体数	リアルタイムPCR			
			NV		HAV	Sa
			G1	G2		
中国	アカガイ	13	821	0	0	0
	ハマグリ	19	0	0	0	0
	カキフライ	1	115	0	0	0
韓国	アカガイ	12	0	0	0	0
	タイラガイ	3	0	4292	0	0
	ムールガイ	1	0	0	0	0
北朝鮮	アカガイ	2	0	0	0	0
	ハマグリ	10	0	211	0	0
アメリカ	カキ	4	0	0	0	0
インドネシア	ブラックタイガー	2	0	0	0	0
	キングエビ	1	0	0	0	0
フィリピン	ブラックタイガー	1	0	0	0	0
ミャンマー	ブラックタイガー	1	0	0	0	0
計		70	2	2	0	0

表3 食中毒発生状況

事例番号	発生日月	発生地	原因施設	原因食品	概要
1	2001.1.20	大和市	寿司店	カキ	10名中8名発症
2	2001.1.22	南足柄市	飲食店	アサリ、甘エビ	6グループ123名中4グループ26名が発症
3	2001.4.11	小田原市	飲食店	イカ塩辛	みやげ用の塩辛を食べた人を含め112名中36名発症
4	2002.2.1	厚木市	不明	不明	2日にわたり異なる仕出し弁当を食べ、34名中16名発症
5	2002.2.3	藤沢市	寿司店	カキ	18名中13名発症
6	2002.2.3	藤沢市	レストラン	カキ	64名中39名発症、従事者もカキを摂食
7	2002.2.12	厚木市	寿司店	カキ	16名中6名発症、別ロットのカキの検査を実施
8	2002.2.22	厚木市	飲食店	カキ	20名中8名発症、別ロットのカキの検査を実施
9	2002.2.24	茅ヶ崎市	飲食店	帆立稚貝	16名中4名発症、帆立の酒蒸しの加熱が十分でなかったため再度加熱してもらった。再加熱前の帆立を食べた人が発症した。帆立は凍結保存してあった。

表4 食中毒事例検査結果

事例番号	検体名	検体数	RT-PCR 陽性数	ハイブリ ダイゼイ ション陽 性数	NV 型
1	患者便	4	2	2	G1, G2
	従事者便	3	0		
2	患者便	18	13	9	G2
	従事者便	7	0		
3	患者便	16	11	8	G2
	従事者便	19	1	1	G2
	塩辛	5	3	3	G1,G2
4	患者便	5	4	4	G2
	従事者便	2	0		
5	患者便	12	6	6	G2
	従事者便	4	0		
6	患者便	17	11	9	G1,G2
	従事者便	2	1	1	G1
7	患者便	3	2	2	G2
	カキ(別ロット)	1	0		
8	患者便	6	3	1	G2
	従事者便	4	0		
	カキ(別ロット)	1	0		
9	患者便	7	4	4	G2
	従事者便	10	0		
	ホタテ	1	0		

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 長谷川斐子 国立感染症研究所 主任研究官

研究要旨

輸入食品(特に海産物)中の微生物汚染状況の把握に“感染性”のあるウイルス検出という観点で、培養細胞を用いたウイルス分離培養を行った。エンテロウイルス、アデノウイルス、レオウイルス、A型肝炎ウイルスを考慮し、それらのウイルスに感受性をもつ細胞(Hep2, RD-18S, GL-37)を用いた。109検体中の1検体から非ポリオエンテロウイルスが分離された。海産物中のウイルス汚染が明らかになったが、重大な健康上のリスクはないと考えられる。

A. 研究目的

食品中の微生物汚染とヒトの感染症との関連性を調査するため、輸入海産物中のウイルス検出を培養細胞を用いて行い、感染性のあるウイルスを分離培養し、健康リスクについて考える。

B. 研究方法

培養細胞で分離されると考えられるウイルスはエンテロウイルス、アデノウイルス、レオウイルス、A型肝炎ウイルスなどであるため、それらのウイルス検出を考慮した方法を使用する。

検体: 国立公衆衛生院および神奈川県衛生研究所で処理された輸入海産物(貝類、エビ)の乳剤を、濃度約10%にして12,000gで10分間遠心した上清。

細胞: Hep2細胞はエンテロウイルス、アデノウイルスに感受性を持つ。RD-18S細胞は

主にエンテロウイルスを目的とする。GL-37細胞はA型肝炎に特異的に感受性を持つが、エンテロウイルス、レオウイルスにも良い感受性を示す。GL-37細胞は国立感染症研究所、ウイルス製剤部の戸塚敦子博士により作成され、分与された。増殖培地は10%ウシ胎児血清加 Eagle's MEM, 維持培地は2%ウシ胎児血清加 Eagle's MEM を使用した。

分離方法: 検体 0.2ml を各培養細胞(24 well plate)2穴に接種し、37°Cで1時間吸着させる。接種検体を除き、維持培地を1mlづつ加えて37°Cの炭酸ガスフラン器内で培養する。細胞変性効果(CPE)の有無を少なくとも7日間観察する。CPEが確認されない場合は凍結融解を3回行い、2穴の培養液を集めて遠心(3,000rpm 10分)し、上清0.2mlを新しい培養細胞に接種、培養する。GL-37細胞に関しては1週間ごとに維持培地で液

かえし、約1ヶ月観察する。

ウイルス同定：中和、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)など最適なものを使用する。ポリオウイルスが検出された場合は血清型を同定後、型内鑑別を RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism)解析で、野生株かワクチン株かを決定する。CPE が観察されれば、さらに1代培養し同定する。

C. 研究結果

国立公衆衛生院からの49検体、神奈川県衛生研究所からの60検体からウイルス分離を試み、1検体(横浜-2)がHep-2細胞でCPEを示した。このCPE因子はRD-18S細胞にも感受性があった。CPEはエンテロウイルス様であったので、核酸を抽出しエンテロウイルス、ポリオウイルスに対するプライマーを用いて、PCRを行った。非ポリオエンテロウイルスであることが同定された。エコーウイルスであった。結果を表1,2に示す。

D. 考察と結論

約110検体(主に中国、韓国から輸入された貝類)から培養細胞を用いてウイルス分離を試み、1株のエンテロウイルスが分離された。汚水、河川水からはエンテロウイルス、レオウイルスなどが分離され、ポリオワクチン接種時期には、ポリオウイルスがかなり分離される。河川水の流れ込む海中で生息する貝類がそのようなウイルスに汚染され、ウイルスが貝類の中で生き続けていると考えられる。

1検体からのウイルス分離であったが、検査された検体数は輸入数に比べ、わずかであり、全体的には汚染された海産物はかなり多いだろう。

今回分離されたウイルスはエコーウイルスで、ヒトに感染しても必ずしも発症しない。健康人の腸内から検出されることもあり、多大な健康被害が起きる可能性は少ないと考えられるが、さらに調査を続ける必要がある。

表1 輸入食品の組織培養によるウイルス分離結果

国名	種類	検体数	組織培養		
			Hep2	RD18S	GC37
中国	アカガイ	6	—	—	—
	アサリ	17	1	—	—
	ハマグリ	39	—	—	—
韓国	アカガイ	21	—	—	—
	アサリ	1	—	—	—
	タイラガイ	4	—	—	—
北朝鮮	アカガイ	2	—	—	—
	アサリ	9	—	—	—
	ハマグリ	3	—	—	—
アメリカ	カキ	3	—	—	—
不明	アカガイ	1	—	—	—
	ハマグリ	2	—	—	—
	カキ	1	—	—	—
計		109	1	0	0

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、国内の食品及び環境中のウイルス汚染に関する研究

分担研究者 藤本嗣人 兵庫県立衛生研究所微生物部 主任研究員

研究要旨

輸入された食品 100 検体（貝類 81 件、えび類 19 件）から 3 種類の細胞を用いてエンテロウイルス分離を試みたが、ウイルス分離結果は陰性であった。このことから、上記食品の感染はなかったと考えられた。しかし、今回の材料は秋から冬期に採取したもので、エンテロウイルスの好発時期である春から初夏のものがなかったこともその要因として考えられる。

A. 研究目的

輸入食品についてエンテロウイルスの分離試験を行うことにより、輸入食品の安全性を試験する。これにより食品のエンテロウイルス汚染における健康被害リスク評価を行うための基礎データを得る。

B. 研究方法

3 種類の細胞（RD-18S、Hep-2 および GL37）を使用して 100 検体〔中国（38 件）、韓国（31 件）、北朝鮮（12 件）から輸入された貝類 81 件およびインドネシア（9 件）、インド（8 件）、ベトナム（1 件）、マレーシア（1 件）から輸入されたブラックタイガー 19 件〕からウイルスを分離した。

C. 研究結果

- ① 輸入魚介類 100 検体からエンテロウイルスは分離されなかった（詳細は別表のとおり）。
- ② ハマグリは培養細胞を変性させる傾

向が強く、赤貝も同様であった。タイラガイは、これらに比べると非特異的な細胞変性が少なく、ブラックタイガーではほとんど細胞への障害は観察されなかった。

D. 考察

貝類は水中でウイルスを濃縮することが知られ、エンテロウイルスは貝類により濃縮されることが知られている。しかし、今回の 100 検体からはエンテロウイルスは分離されなかった。使用した貝類 81 件のうち、赤貝が 40 件、ハマグリが 33 件でカキは加工品が 1 件しかなかった。カキの養殖海域は、その発育を良好なものとするため植物性プランクトンの発生が良好な内海が多く、河川や下水からの影響を受けやすいとされる。したがって、輸入カキがエンテロウイルスに汚染されている可能性は他の貝よりも高いことが予想され、今後はより多数の輸入カキについても調査することが望ましいと思われる。

る。ちなみに 1997 年のカキ輸入量は韓国産を中心に 6000 トン以上にのぼるとされ、日本の主要なカキの産地の一つである宮城県の 4430 トンより多い。

本研究では培養細胞によるウイルス分離を試みたが、この方法の利点は感染性があるウイルスの存在を証明できることである。現在、その迅速性の点から RT-PCR がエンテロウイルス検査に急速に取り入れられている。しかし、このウイルスゲノムを検出する方法では検出されたウイルスの感染性を証明できない。食品の安全性を確保する上でウイルスの感染性の有無は重要な意味を持つ。なぜなら、たとえウイルスが混入していたとしても感染性がなければ無害だからである。ウイルス分離の欠点である分離に要する時間の長さは、使用する細胞のウイルスに対する感受性の違いによって変化する。ウイルス分離に際しては、最もそのウイルスに感受性が高い細胞を使用することが重要である。

今回、ウイルス分離に使用した細胞のうち GL37 細胞は国立感染症研究所の戸塚敦子ウイルス製剤部室長が A 型肝炎ウイルスの増殖用に開発した細胞である。本研究では A 型肝炎ウイルスも重要な調査対象の一つであり、さらにこの細胞がほとんどのエンテロウイルスに感受性があるとされるため使用した。RD-18S 細胞は現在、汎用されている RD 細胞のクローン株でありエコーウイルスへの感受性が高く、コクサッキー A 群ウイルスにも感受性があることから用いた。Hep-2 細胞は RD 細胞で感受性がほとんどないコクサッキー B 群ウイルスにも感受性があ

りアデノウイルスの分離にも適しているため使用した。

2000 年の 10 月にわが国を含む西太平洋地域で強毒野生ポリオウイルスの根絶宣言がなされた。しかし、2000 年の 7 月から 12 月に強毒野生ポリオウイルスが根絶されたとされるハイチおよびドミニカ共和国において 1 型ポリオワクチンの毒力復帰変異ウイルスにより 20 名程度のポリオ患者が発生した。日本において国立感染症研究所の吉田ら (Lancet 2000 Oct 28;356(9240):1461-3) が河川および下水からポリオウイルスを分離してそのゲノムを調べたところ、すべてワクチン株由来であったものの強毒型に復帰したものが多数確認されている。したがって、貝類からポリオウイルスが検出された場合、強毒復帰したものか否か、その分離株の変異について調査することが重要と考えられる。

E. まとめ

輸入された食品 100 検体 (貝類 81 件、えび 19 件) から 3 種類の細胞を用いてエンテロウイルス分離を試みたが、ウイルス分離結果は陰性であった。このことから、上記食品の感染はなかったと考えられた。しかし、今回の材料は秋から冬期に採取したもので、エンテロウイルスの好発時期である春から初夏のものがなかったこともその要因として考えられるので、今後年間を通して検査を行う必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

Ono K., Rai SK., Chikahira M.,
Fujimoto 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、楠田
均、岡藤 輝夫、芥川 宏、吉田 真策、河
合 徹、吉田 茂、長谷川 斐子、吉田 弘、
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.

2. 学会発表

藤本嗣人、近平雅嗣、吉田茂、吉田茂、長
谷川斐子、進藤奈邦子、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、日本ウイルス学会(2001)大
阪.

表1 輸入食品の組織培養によるウイルス分離結果

国名	種類	検体数	Hep2	RD18S	GL37
中国	アカガイ	17	-	-	-
	ハマグリ	20	-	-	-
	カキ	1	-	-	-
韓国	アカガイ	23	-	-	-
	ムールガイ	1	-	-	-
	ハマグリ	1	-	-	-
	タイラガイ	6	-	-	-
北朝鮮	アカガイ	1	-	-	-
	ハマグリ	11	-	-	-
インド	ブラックタイガー	8	-	-	-
インドネシア	ブラックタイガー	9	-	-	-
ベトナム	ブラックタイガー	1	-	-	-
マレーシア	ブラックタイガー	1	-	-	-
計		100	0	0	0

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 ベトナム小児における Norwalk-like virus 感染に関する研究

分担研究者 牛島 廣治 東京大学大学院医学系研究科発達医科学 教授

研究協力者 Doan TP Lan, Grant S. Hansman 東京大学院医・発達医科学

西尾 治 国立公衆衛生院衛生微生物学部

研究要旨

1999 年 12 月から 2000 年 3 月にかけて、ホーチミン市第一小児病院で 82 のロタウイルスとアデノウイルス陰性の検体から RT-PCR により Norwalk-like virus (NLV) を検査した。21 が陽性で遺伝子解析により GII であった。2 つの群と、1 検体は中間型であった。1 つの群は Arg320 に、もう 1 つの群は Switzerland NLV AF402319 に近縁であった。

A. 研究目的

海外からの輸入貝類からの NLV 感染が報告されている。ヒト一貝の感染を考えると海外でのヒトの感染についても調査する必要がある。ベトナムでの NLV の成績がないので行った。

B. 研究方法

1999 年 12 月から 2000 年 3 月にホーチミン市第一小児病院で集めた下痢便 337 検体のうち、82 のロタウイルスとアデノウイルス陰性の検体において NLVGI と GII のポリメラーゼ領域のプライマーを用いて RT-PCR で NLV を調べた。陽性の検体ではカプシド領域とポリメラーゼ領域の遺伝子解析を行った。系統樹を作製し既存の株および得られた株間で比較した。また、研究班とデンカ生研が中心で作製の NLV 診断 EIA キットも利用した。

C. 結果.

82 のロタウイルス、アデノウイルス陰性の検体で GI はなかった。ポリメラーゼ領域の RT-PCR で 21 検体が GII 陽性で、そのうち 17 検体がカプシド領域で GII 陽性となり、また 14 検体が EIA で陽性であった。ポリメラーゼおよびカプシド領域を遺伝子解析し、系統樹を作製した。11 検体が 1 群、9 検体が 2 群に分かれ、1 検体はその中間を示した。1 群のものは 1999 年見いだされた Switzerland NLV AF402319 に近く、2 群のものは Arg320 と近縁であった。EIA でみると 1, 2 群合わせて 21 検体中 14 検体が陽性であった。1 群の 11 検体中 9 検体が陽性、2 群では 9 検体中 4 検体が陽性であった。

D. 考察

今回は GII のみ見いだされ、AF402319 様と Arg320 様の NLV があった。AF402319 は 1999 年スイスでのジュニア

オリンピックで最初に見出された。この事とベトナムでわれわれが見出した1群の株との因果関係ははっきりしない。また2群は1995年アルゼンチンで見出された Arg320 と似ていた。2群の方が EIA での検出が低かった。また、genogroup12 とともに検出陽性・陰性があり他の要因も考えられた。今後、ベトナムの株に関して継続的に諸外国の NLV と比較しながら遺伝子の変化を考えていきたい。

E. まとめ

ホーチミン市第一小児病院でRV, Ad 陰性の82の糞便検体から21が陽性であった。すべてGIIで、Arg320と9検体が、Switzerland NLVと11検体が近縁であった。

F. 研究発表

1. 論文発表

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.

Adhikary AK, Ushijima H. Rapid

detection and typing of oculopathogenic strain of subgenus D adenoviruses by fiber-based PCR and restriction enzyme analysis. *Investigative*

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

Yagyu F, Ushijima H. et al. Differentiation of subtype B and E of human immunodeficiency virus type 1 by polymerase chain reaction using novel env gene primers. *J Virol Methods* 101:11-20, 2002.

G. 知的所有権の取得状況

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 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

分担研究者 牛島 廣治 東京大学大学院医学系研究科発達医科学 教授

研究協力者 秋原 志保、東京大学院医・発達医科学

沖津 祥子 東京大学院医・発達医科学

西尾 治 国立公衆衛生院衛生微生物学

研究要旨

1 保育施設において、14 ヶ月にわたり 44 人の幼児から 921 の糞便検体を得てロタウイルス (RV)、アデノウイルス (Ad)、アストロウイルス (AV)、ノーウォーク様ウイルス (NLV) を調べた。1999 年 6 月から 2000 年 7 月にかけて 5 回の集団下痢が見られた。1 回目は AV+NLV で、2 回目は Ad、3 回目は NLV、4 回目は不明、5 回目は AV であった。2 つの AV はともに血清型 1 で株間のホモロジーは 97-100% であった。最初の NLV は Tronto 類似の GII で、後の NLV は Camberwell/Lordsdale であった。NLV と AV で臨床症状には差があるものとなないものがあった。食品との関係は見い出されなかった。今までこのように 4 つのウイルスを前向きに保育施設で調べたものはない。

A. 研究目的

ウイルス性下痢症特に NLV は乳幼児施設などで流行が見られ、公衆衛生学的には重要な問題である。NLV は食品との関係で集団発生が注目されているが、乳幼児でははっきりしない。ここでは前向きの研究として 14 ヶ月間保育園で下痢症ウイルスを調べた。

B. 研究材料と方法

東京の 1 保育施設で 1999 年 6 月から 2000 年 7 月まで毎週 1 回乳幼児の糞便からウイルス検査を行った。下痢の時は週 2 回以上採取した。最初は 14 人の乳幼児であったが、途中で入園・退園したりした。

また次の 4 月から新しい乳幼児が入ってきた。全体で 44 人の乳幼児が調べられた。糞便は採取した後、10-20% に薄められ、-30℃ に使用時まで保管された。RV, Ad は EIA でスクリーニングするとともに、RT-PCR, PCR で確認した。また AV, NLV はそれぞれ共通のプライマーおよび型/グループ特異プライマーを用いて RT-PCR を行った。さらに PCR 産物は遺伝子解析を行い、系統樹を作り比較検討した。

C. 研究結果

延べ 44 人の乳幼児で平均採取期間は 27 週 (7-61 週) であった。921 検体が集められ RV, Ad, AV, NLV が調べられた。5

回の下痢の集団発生が見られ、全体で 14 週の下痢であった。1 回目は 1999 年 6 月で AV が 13 例 RT-PCR で見いだされた。15% は下痢が、85% は無症状であった。最初 1 人の症例において AV が見られたが、6 例では次の週から AV と NLV が認められた。5 回目は 2001 年 6 月で、AV が 25 例 RT-PCR で見いだされた。RT-PCR では平均 1 週間 (1 日—22 日) 検出された。3 回目は NLV で 12 月から 2 月にかけて 15 人に見られた。31% に症状があり、69% は無症状であった。NLV は平均 14 日 (1—56 日) 見いだされた。2 回目の流行はアデノウイルスであった。型は決定できなかった。4 回目はウイルス、細菌は見いだせなかった。約 2 週間下痢が続いた。遺伝子解析を AV と NLV で行った。2 つの AV はともに血清型 1 で株間のホモロジーは 97—100% であった。1 回目の NLV は Tronto 類似の GII で、3 回目の NLV は Camberwell/Lordsdale であった。NLV と AV で臨床症状には差があるものとなないものがあった。食品との関係はなかった。

5 人の乳幼児が NLV に 2 回感染した。またこの 5 人は AV についても 1 回目に感染を受けていた。ロタウイルスはこの 14 ヶ月認められなかった。

D. 考察

米国の保育園での報告では、36 ヶ月未満の子どもでは、下痢症になる頻度がその年齢以上より 17 倍も高い。また、自宅のみでケアしている子どもよりも多い。また米国でも保育園では 1 人の乳幼児に年 6 回ほどの下痢が見られるとしている。しかしながら、遺伝子増幅法を用いて

我々のように、4 つのウイルスを前向きに保育施設で調べたものはない。AV の感染が、なぜ 6 月に 2 回生じたのかははっきりしない。ただ 4 月は新しい子どもが入園するので免疫を受けていない子どもが感染するのも知れない。また 2 人の子どもは 2 回 AV に感染していた。AV の糞便中の検出期間は EIA では短い、PCR を行うとより長かった。無症状の感染が多くみられ、定期的に調べないと見逃される恐れがあった。ボランティアでの NLV 経口投与に関して、1 回目は 60% が、2 回目は 18% に下痢が見られた。3 回目は全くなかった。このことから免疫は多くではできるが、反復させても一部の人で抗体ができにくいことが見られた。また、GI と GII についてのボランティア実験もある。同じゲノグループでは抗体の反応がより高かった。しかしながら感染防御には関係がなかった。このようなことを考えると再感染があってもおかしくない。米国の報告では NLV 感染の多くは無症状であるが、ここではほとんどが症状を示した。現在 Toronto および Camberwell/Lordsdale が流行している。そして多くが 90% 以上保持されている。2 回目の集団下痢は EIA でアデノウイルスが見出されたが、長く陽性のことがあった。おそらく扁桃、アデノイドなどに長期間存在することによると思われる。保育園の制度では 12 ヶ月以下の子どもを扱う所では、看護婦がいることが条件となっており、医師は 1 月に 1 回は訪問することになっている。感染の危険が多いのはおむつの交換の時と考えられる。看護婦はおむつ交換時に手を洗うように指導

されている。しかしそれでも不十分なようである。もう1つはトイレである。トイレおよびその近辺を子ども、職員、スタッフが通る。このことも感染の伝播に考えなければならない。トイレの状況はわが国中の保育所に関係する。手洗いの励行はもっと強調される必要がある。スタッフとともに養護者も病気について知っておくことが必要である。

E. まとめ

1 保育園で14ヶ月前向きにウイルス性下痢症の診断を行ったところ、AV, NV, Adの集団発生が見られた。遺伝子診断では症状がなくても排泄期間が3週間にも及び、他への伝播の危険性が考えられた。食品との関係は考えられず、保育園内での流行に環境の要素が考えられ、職員、扶養者の教育指導が必要と考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kudo S, Ushijima H et al. Molecular characterization in the VP7, VP4 and NSP4 genes of human rotavirus serotype 4(G4).

Wang QH, Nishio O, 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.

Zhou Y, Ushijima H et al. Genetic analysis of the capsid region of astrovirus. *J. Med. Virol.* 64:245-255,

2001.

Adhikary AK, Ushijima H. Rapid detection and typing of oculopathogenic strain of subgenus D adenoviruses by fiber-based PCR and restriction enzyme analysis. *Investigative*

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

Yagyu F, Ushijima H. et al. Differentiation of subtype B and E of human immunodeficiency virus type 1 by polymerase chain reaction using novel env gene primers. *J Virol Methods* 101:11-20, 2002.

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 鈴木 宏 新潟大学大学院医歯学総合研究科
国際感染医学講座公衆衛生学分野
協力研究者 坂井胤、斎藤玲子 新潟大学医学部公衆衛生学
西川眞、篠川旦 新潟県保健環境科学研究所ウイルス科

研究要旨

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ミュレーションへの予備調査として、本年は食品汚染ではないがウイルス性で糞口感染である類似性に注目し、無菌髄膜炎を検討した。患者の地理的展開の地系列的解析により、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汚染を明示できた。この流行は4ヶ月に亘る長期間であり、手洗い励行などによる阻止対策遂行への啓蒙活動にこの表現・解析手法が有効である可能性が示唆された。

次年度に向け、ノーウオークウイルス(NV)由来の食中毒の分子疫学も行った。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 genotype 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。

A 研究目的

主にカキからの食品汚染と思われるNV感染症が近年増加傾向にある。本ウイルスは少量でも感染が成立し、不顕性の保菌者や汚染食品を介しての流行には、汚染源や感染経路を特定化後、遮断する方策を取ることが必要になる。しかし、ウイルス株間の時間や地理的分布も加味し、散発と集団発生との関連性からの検討は不十分のままである。

古典的にはロンドンのコレラ流行におけるJ.Snowの地図を用いた下痢症感染経路の解

析法が有名である。最近では、コンピューターシステムと地図情報を結合したGISが開発され、その有用性が検討されつつある。食品汚染による食中毒例に本GISによる疫学調査の成果の危機管理・対応へ応用は未知の分野である。

本年度は食品汚染ではないがウイルス性で糞口感染である類似性に注目し、無菌性髄膜炎流行時の県内2地域における患者発生状況の疫学解析を試みた。また、次年度に本法によるNV感染症を検討すべく、分子疫学的分析も行った。

B 研究方法

1. GISの無菌性髄膜炎流行での解析

我々は無菌性髄膜炎流行時の県内2地域での患者発生状況を患者の住所を入力したGISとして、GISソフトウェアを用いて(ArcView)地図上に図示し、流行動態を解析した。

2. NV感染症の分子疫学的分析

NVによる集団急性胃腸炎事例と同時期に発生した胃腸炎散発事例からの検出株間、各事例検出株と食品検出株等との関連性、更には両胃腸炎間の地理的な関連性の有無を検討した。

調査は、本研究班で定めた方法及び平成13年11月16日付け食監発第267号厚生労働省医薬局食品保健部監視安全課長通知に定めた方法に基づいて行った。検査材料は、平成13年4月から翌年1月までの9か月間に新潟県内で発生した集団急性胃腸炎患者の糞便と、県内5か所の感染症サーベイランス定点医療機関で得られた感染性胃腸炎患者糞便及び食品等である(表1)。本ウイルスの遺伝子系統樹解析はUPGMA法によりポリメラーゼ領域222bpの部分について行った。

C 結果・考察

1. GISの無菌性髄膜炎流行での解析

無菌性髄膜炎患者の住所から患者の発生状況が地図上に時系列的に提示可能となった。内容的には、村から町へと道路に沿った流行の移動(図1)、村では保育園、町では学校を中心とした発生状況が時系列手的に明確に示された。また、村全体と町の一部で家族内感染も見られた(図2)。この流行は4ヶ月に亘るものであり、流行地での手洗いの励行などの阻止対策遂行への啓蒙にこの表現・解析手法が有効である可能性が示唆された。

2. NV急性胃腸炎の分子疫学的分析

6つのNV集団胃腸炎発生事例(事例)に於いて、小学校を除いて一峰性ないしは、連続的な流行曲線を示し、多くはヒトからヒトへの感染であることが示唆された。

事例1、3はGenogroup 2、事例2、4、5、6はGenogroup 1であった(図3)。事例1、2、3毎の検出株間の遺伝子相同性は100%-95.9%、事例5は99%以上であり、事例毎に同じgenotypeのウイルスによる感染が発生していると思われた。しかし、事例6では、87.1%-99.6%の差異があり、感染源に複数のgenotypeの存在が示唆された。

事例1の3株と前年1月の小児急性胃腸炎検体から検出した株は95.9%の高い遺伝子相同性を示し、2年前に同保健所管内でカキによる食中毒患者で検出した株とも高い相同性を認めた。

事例3と同時期の同地域で得られた小児急性胃腸炎患者検体から同一のgenotypeを検出した。

事例4と同じgenotypeを離島の小児急性胃腸炎患者、翌月発生した事例6の小学校教員から確認され、この時期に広く新潟県内に同じgenotypeによる急性胃腸炎が蔓延していたことが示唆された。しかし、いずれに於いても事例に関係する食品からはNVを検出できなかった。

二峰性の患者発生を認めた事例5において、初発の従事者と後発の宿泊患者の両者のNV遺伝子の相同性は99.6%と高く、同宿者が県外の自宅に帰った後の各地方衛生研究所における検出株間でも一致した。これは調理従事者からの二次汚染であり、保菌者による汚染拡大の危険性を強く示唆した。

5月から12月の7か月間に同一医療機関の小児急性胃腸炎検体から96.7%と高い遺伝子相同性の3株が検出され、前年1月の集団食中毒原因である生食用カキからの株でも98.6%の遺伝子相同性を示していた。これは

地域内でNV感染が継続し、その供給源としてカキが関与する可能性が示唆された。 11

これらの疫学結果は米国CDCのデータで提示されている以下の点も注目し、対策を練る必要がある。

- 1) 100個以下のウイルスで感染可能
- 2) 不顕性の状況で2週間もウイルス排出
- 3) 10ppm以下の塩素濃度、凍結、60Cでもウイルスは生存可能
- 4) ウイルスの多様なgenotypesと抗原型
- 5) 再感染・発症

D まとめ

1. GISの無菌性髄膜炎流行での解析

無菌性髄膜炎は村から町へと道路に沿った流行の移動、村では保育園、町では学校が主流で、家族内感染が明示され、GIS上で患者の時系列的、地域的な展開による解析と、流行地での手洗いの励行などの阻止対策遂行への啓蒙にこの表現が有効である可能性が示唆された。

2. NV感染症の分子疫学的分析

地域内で小児の散発性急性胃腸炎と同時期に同一genotypeによる集団急性胃腸炎事例が高頻度に発生し、時には同一genotypeが長期間検出されていた。

集団事例の多くが、ヒトからヒトへの感染、特に保菌者として調理従事者を介して見られ、その対策は急務である。

同一医療機関の小児急性胃腸炎検体から7か月間に遺伝子相同性が高い株が連続して検出され、その前年の集団食中毒原因食品である生食用カキからも高い遺伝子相同性を示した株が採取され、感染源としてのカキの役割が大きい可能性も示唆された。

E. 研究発表

1. 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.