

厚生労働科学研究費補助金  
食品・化学物質安全総合研究事業

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14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 西尾 治 (国立感染症研究所)

平成15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. 市販生カキおよび食中毒原因食材あるいは有症苦情カキ  
におけるノロウイルス汚染について ----- 19  
西尾 治
2. 市販カキのノロウイルスおよびA型肝炎ウイルスの汚染と  
安全性に関する研究 ----- 27  
西尾 治
3. ウイルス性食中毒様集団発生事例の疫学、ウイルス学的解析  
について ----- 36  
西尾 治
4. カキ養殖海域におけるノロウイルスの定量的定点観測について ----- 43  
福田 伸治・西尾 治
5. リアルタイムPCR法で得られた低い値の信頼性について ----- 56  
篠原 美千代・西尾 治
6. 検査法の評価、食品のウイルス汚染状況調査・研究 ----- 60  
春木 孝祐
7. 海域および食品のウイルス汚染状況調査・研究 ----- 67  
西 香南子
8. 海域のウイルス汚染状況調査  
食品媒介ウイルス感染症の集団発生状況調査 ----- 80  
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に関する研究 ----- 86  
大瀬戸 光明

10. 食品中のウイルス学的安全性の評価に関する研究	-----	94
杉枝 正明		
11. 輸入食品のウイルス汚染状況調査・研究	-----	100
古屋 由美子		
12. 輸入食品からのウイルス分離に関する研究	-----	105
長谷川 斐子・西尾 治		
13. 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	-----	109
藤本 嗣人		
14. イムノクロマトグラフィー法によるノロウイルス迅速診断法の開発と評価	-----	117
牛島 廣治		
15. 食品汚染と危機管理、対応	-----	121
鈴木 宏		
16. 食品中の細菌汚染状況の把握と安全性の評価に関する研究	-----	130
伊藤 健一郎		
<b>Ⅲ 研究成果の刊行物・別冊</b>	-----	143
<b>Ⅳ 付録</b>		
ノロウイルス検査法マニュアル		
A型肝炎ウイルス検査法マニュアル		

I

厚生労働科学研究費補助金

(食品・化学物質安全総合研究事業)

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 14 年度 総括研究報告書

主任研究者 西尾 治 (国立感染症研究所)

**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（国立感染症研究所 感染症情報センター第六室長）

**研究要旨**

平成 13 年に厚生労働省に届けられた食中毒のうち小型球形ウイルス（ノロウイルス、ノーウォークウイルス）が病原物質別の第一位であり、事例数ではカキによるものが半数近くを占めており、カキのウイルス学的安全確保が緊急課題となっている。さらに A 型肝炎ウイルス感染患者には食品を介するものも存在していると推定される。本年度は東南アジア地域等で常在している E 型肝炎ウイルスの食品汚染問題がマスコミ等で大きく取り上げられた。また大腸菌においても食品から新しい型が検出されておりその対応が急務である。

本研究は上記問題点を考慮し、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。

本研究では食品の安全性評価のために食品中のノロウイルスおよび A 型肝炎ウイルス汚染を定量的に調査・研究を行った。

国内産食用生カキでは 8%、加熱用カキは 46% からノロウイルスが検出された。生食用生カキ 1 件 (0.2%) から極めて微量の A 型肝炎ウイルスが検出された。

カキ養殖海域の海水およびカキのノロウイルス汚染は 1 月から 2 月に陽性率が高く、同時期にはカキによる食中毒事例が多発し、海水およびカキ汚染と食中毒発生との関連性が強く示された。

カキ養殖筏の垂直調査では海面の上層から中層（7 m）のカキがノロウイルスに汚染されやすい傾向が認められた。

ウイルス性食品媒介集団発生にはカキのようにカキの体内に蓄積しているウイルスによるものと、ふん便あるいは吐物に大量に存在するノロウイルスが食品に付着することによって発生するものとが認められた。

食中毒原因食材と推定され同一ロットあるいは海域のカキでは 20 事例のうち 15 事例 (75%) のカキに 1 個当たりノロウイルスが 125 コピー以上の汚染を認めた。

主に東南アジアからの輸入魚介類はノロウイルスに 9%、A 型肝炎ウイルスに 0.5% 汚染されていた。E 型肝炎ウイルス、野性ポリオウイルスは陰性であった。

1999-2001 年における集団急性胃腸炎事例と小児の散発性急性胃腸炎について地図情報システムを用い検討したところ、分子疫学的には両疾患の関連性が強く示唆された。

過去 20 年間の変遷ではノロウイルス感染症のピークは 12 月と 1 月と変化は見られていないが、ロタウイルス感染症のピークは、90 年代前半までの 1, 2 月から 90 年代中間から約 1 ヶ月間遅延傾向が見られた。

局在性付着大腸菌では、血清型または *eae* 遺伝子型により、病原性に関連する遺伝子に変異または欠損が認められた。瀉物では、腸管出血性大腸菌 O157 と他の病原大腸菌及びサルモネラは全て陰性であったが、黄色ブドウ球菌は 1 件（小松葉）から検出された。

### 分担研究者

伊藤健一郎 国立感染症研究所感染症情報センター第五室長

牛島廣治 東京大学医学部大学院研究科 教授

鈴木 宏 新潟大学医学部公衆衛生学講座教授

藤本嗣人 兵庫県立健康環境科学研究所センター主任研究員

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

大亀 路生、沖津 祥子 東京大学

坂井 胤、斎藤 玲子 新潟大学

林 志直 東京都立衛生研究所

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

野田 衛 広島市衛生研究所

西田 知子 山口県環境保健研究センター

吉澄 志摩 北海道立衛生研究所

三上 稔之、筒井 理華、石川 和子 青森県環境保健センター

徳竹 由美 長野県衛生公害研究所

渡辺 節、植木 洋 宮城県保健環境センター

森屋 一雄、安藤 克幸 佐賀県衛生薬業センター

岡本 その子 栃木県保健環境センター

木村 博一、斉藤 美香 群馬県衛生環境研究所

篠原 美千代 埼玉県衛生研究所

近平 雅嗣 兵庫県立健康環境科学研究所センター

勢戸 祥介、入谷 展弘 大阪市立環境科学研究所

近藤 玲子、山下 育孝、吉田 紀美 愛媛県立衛生環境研究所

田中 俊光 千葉市保健所

西川 眞、篠川 旦 新潟県保健環境科学研究所

松崎 充宏 日本海事検定協会理化学分析センター

吉田 弘、秋山 美穂、山口 卓、長谷川 斐子、山下 和子、岡部 信彦

## 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（ノロウイルス、ノーウォークウイルス）、その他のウイルスが加えられた。ウイルス性食中毒事例ではノロウイルスが起因となっている。平成13年度に厚生労働省に届けられた食中毒事例における原因物質別では小型球形ウイルス（ノロウイルス）による患者数が第1位で、事例の半数近くは生カキによって起きている。従って、ウイルス性食中毒様集団発生の防止が急務であり、特に生カキのウイルス学的安全性確保が社会的な緊急課題となっている。A型肝炎ウイルスによる食中毒事例報告は潜伏期が1ヶ月と長く、感染源の特定が困難であり極めて少ない。しかし毎年、300名程度のA型肝炎患者は海外渡航歴がなく、周りからの二次感染も考えられない感染源不明である。これらの患者には食品を介するものも存在すると推測されている。また本年度はE型肝炎ウイルスも社会的な問題ともなっている。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。近年消費者の健康への関心は高く、より安全な食品を求めていることから、食品の微生物学的な安全性の確保が強く望まれている。本研究班では上記の課題を中心として研究を遂行した。

昨年度に引き続き市販カキにおけるノロウイルスとA型肝炎ウイルス汚染実態を定量的に捕え、さらにノロウイ

ルスの遺伝子型から分子疫学的解析を行い、感染経路を明らかにすることを目的とした。

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殆ど調査されていない。昨年度の調査で輸入魚介類を介してノロウイルス、A型肝炎ウイルス等がわが国に侵入にしていることを報告した。本年度もノロウイルスは世界各地に侵淫しており、A型肝炎ウイルスはわが国を除く東南アジアは依然として汚染地帯である。食品を介して侵入する危険性を無視できないので継続して研究することとした。さらに野生ポリオウイルスは西太平洋地域で撲滅されたものの、依然として西アジア、アフリカ地域等では残存しているため、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も把握することにした。

食品中のノロウイルスおよびA型肝炎ウイルス検出に際しては安全性評価のためにウイルス定量が行えるリアルタイムPCR法を導入し、食品のウイルス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。

カキの安全性の確保には海域に流入する河川水、養殖海域におけるウイルス汚染実態を知ることが極めて重要である。そこで本年度は昨年度よりも調査海域と調査地点を倍以上に増やし、河川水、海域とカキ汚染の関連性を調査した。また昨年度は同一海域の同一筏で採取した個々のカキによってノロウイルス汚染は様々であった。そこで本年度は海域で最もウイルス汚染を受

け易い場所の特定を目的とした。海域の内湾と外湾、同一筏の垂直調査、すなわち海域の上層、中層、下層での汚染状況を調査・研究した。

ヒオウギ貝およびその養殖海域のプランクトンにおけるノロウイルスとの関連性を明らかにするために調査した。

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を行い、今後の食中毒事例発生の防止策の樹立を目的とした。特に、カキを介する事例の患者および食中毒原因カキからのノロウイルス遺伝子型を決定し、分子疫学的解析をも加えた。

本年度は E 型肝炎ウイルスの問題が社会的な問題として提起された。そこで本研究班においても、本ウイルスの食品汚染の研究を急遽取り組むことにした。E 型肝炎ウイルスは東南アジアでは常在していることから輸入魚介類に、またブタにおける E 型肝炎ウイルスの感染が指摘されており、屠場に搬入されたブタ血清におけるこのウイルスの有無について調査・研究を行うことにした。

食品中におけるウイルス量と発病リスクを明らかにすることが、ウイルス学的安全性の確保において極めて重要である。そこでウイルス汚染量と発病との相関関係を見出すことを目的として、食中毒原因カキあるいは同じロットのものについてウイルス定量と遺伝子型調べ、分子疫学的解析を行うことにした。

近年、カキを介さない大規模な食中毒事例が多発している。この要因とし

て、患者あるいは調理従事者からのふん便中のウイルスを定量し、患者ふん便における感染源の意義について考察した。

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ュミ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。そこで野菜、漬物の本菌の汚染状況と分離方法、遺伝子解析を加えた。

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・検討

昨年度の本研究で現在ノロウイルスの検出に用いているプライマーおよびプローブはアルファトロン型を検出できないことが明らかとなったので、検出可能なプライマーおよびプローブの設定に取り組んだ。

患者のふん便からノロウイルスを 30 分以内に検出できるイムノクロマト法の開発について NV1207 株 (G2/1 クラスター) を用いて行った。

リアルタイム PCR 法における実測値の信頼性を 2nd リアルタイム PCR 法お



よび RT-PCR 法と比較検討した。

## 2. 国産および輸入魚介類におけるウイルス汚染実態調査

国産生食用カキは 517 パック、加熱用カキ 28 パック、1 パックにつきカキ 3 個を検査に用いた。自生カキ 12 ロット、ヒオウギ貝 4 ロットを用いた。

食中毒事例原因カキあるいは有症苦情カキは 20 事例からの 61 件について、ノロウイルスの定量を行った。

輸入魚介類はインドネシア産エビ（ブラックタイガー）2 件、インド産エビ 1 件（ブラックタイガー）、韓国産アカガイ 37 件、タイラギ 13 件、カキ 4 件、アオヤギ、アサリ、ハマグリ各 2 件、アゲマキガイ、シジミ、トリガイ、ホッキガイ、ミルガイ各 1 件を、北朝鮮産ハマグリ 10 件およびアカガイ 1 件、中国産ハマグリ 50 件、アカガイ 28 件、アサリ 10 件、タイラギ 4 件、エビ 3 件、ミルガイ 1 件を、タスマニア産カキ 7 件を、ミャンマー産エビ（ブラックタイガー）1 件、計 183 件を用いた。

貝類は中腸腺 1g を 1 件として 3 件を、エビ類はエビ 200g の中腸腺を検査に用いた。リアルタイム PCR でノロウイルス {カプシド領域のプライマーとプローブを用いて（検査法で確立した方法、本報告書のノロウイルス検出のリアルタイム PCR 法を参照）} と A 型肝炎ウイルス（A 型肝炎ウイルスの検査の項を参照）検出を行った。

輸入魚介類は組織培養法によるポリオウイルスを含む腸管ウイルスの分離を行った。

E 型肝炎ウイルスの検出は輸入魚介類 50 件（アカガイ 19 件、ハマグリ 17 件、タイラギ 6 件、カキ 4 件、エビ 3 件、

アオヤギ 1 件）および生後 6～9 ヶ月の豚血清 80 件を用いて RT-PCR 法で行った。

## 3. 環境中のウイルス汚染実態

養殖海域に流入している河川水 2 地点、二枚貝養殖 9 海域の 30 地点で主に冬期に月 1 回採取した。海域の内湾と外湾、同一筏の垂直調査、すなわち海域の上層、中層、下層で、それぞれの汚染状況を調査した。

プランクトンは 1 海域 1 地点で原則として毎月 1 回採取しウイルス汚染の検査を行った。

河川水および海水は原則として 20L 採取（不純物が多く 20L 濾過できないときには濾過量を減らした）し、陰電荷膜法で濃縮し、ノロウイルスおよび A 型肝炎ウイルスの検出を魚介類と同様方法のリアルタイム PCR 法で行った。

## 4. 食品媒介集団発生状況

食品媒介集団発生 79 事例を調査した。カキ関連食中毒 35 事例からの患者ふん便 227 件、従事者ふん便 154 件、吐物 1 件および食品 57 件についてノロウイルス検査を行った。RT-PCR 法で増幅された産物 65 件について遺伝子配列を決定した。

原因食材が非カキによる食中毒 44 事例の患者ふん便 409 件、従事者ふん便 274 件、吐物 36 件、食品 108 件からノロウイルス検査を行った。RT-PCR 法で増幅された産物 50 件について遺伝子配列を決定した。

患者ふん便 125 件、吐物 5 件および従事者ふん便 35 件についてウイルス量を測定した。

## 5. 地図的・時間的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

## ヨン

危機管理シュミレーションとして1999年～2001年に発生ノロウイルスによる食品中毒様集団発生と小児急性胃腸炎について検討した。さらに過去20年間のノロウイルス感染とロタウイルス感染症について流行様式の変遷を検討した。

### 6. 下痢原性大腸菌の食品汚染と遺伝子診断法の確立

野菜の漬物43件、生鮮野菜31件における大腸菌汚染と、遺伝子解析はese陽性健康者検体59株、患者検体197株について検討した。

## C. 研究結果

### 1. 検査法の確立

昨年度の本研究で現在ノロウイルスの検出に用いていたプライマーおよびプローブはアルファトロン型を検出できないことが明らかとなったので、リアルタイムPCRおよびRT-PCR法でアルファトロン型も検出できるプライマーおよびプローブを設定し、全国の地方衛生研究所のウイルス担当者に通知した。

患者のふん便からノロウイルスを30分以内に検出できるイムノクロマト法の開発はNV1207株(G2/1クラスター)に対するウサギ抗体を作製し、それを用いてイムノクロマトを構築した。NV1207株に属する患者ふん便40件についてイムノクロマトを行ったところRT-PCR法と比較すると検出感度は82.5%、特異性は98.2%であった。

リアルタイムPCR法における実測値の信頼性を2ndリアルタイムPCR法およびRT-PCR法と比較検討したところ、

実測値が10コピー以上を示したときには2ndリアルタイムPCR法およびRT-PCR法ともに陽性で、リアルタイムPCRで10コピー以下の時には他の2つの検査法で必ずしも陽性とならなかった。

### 2. 国産および輸入魚介類におけるウイルス汚染実態調査

カキを含む貝類は、カキ各3個あるいは中腸腺1gについて3件を検査対象とした。リアルタイムPCRで最も大きい価をそのロットの汚染量とした。なお、実測値10コピー以上を陽性とし、1個あるいは中腸腺1gあたりに換算すると125コピーとなる。なお、エビ類は200gから腸管を取り出しそれを検査した。

国産生食用カキは517ロット中41ロット(8%)から、ノロウイルスが検出された。月別では、10月、11月はノロウイルス汚染0%、12月は3%、1月は15%、2月は11%、3月は8%であった。1個当りの汚染量では125 $\leq$ ~<300コピーが16ロット、300 $\leq$ ~<500は10ロット、500 $\leq$ ~<1000は7ロット、 $\leq$ 1000は8ロットに見られた。

市販カキから検出された遺伝子型は12月のものではG2に属するC-9(Lordsdale)が3件、1月はG1に属するC-6(Chiba)が4件、C-3(Winchester)、C-4(Southampton)、C-21、C-30(NV)が各1件、G2に属するC-18(Amestergdon)、C-20(Miami)が2件、C-10(MX)、C-16(Hillingdon)が各1件、2月はG1に属するC-5(Sindlesham)1件、G2のC-18(Amsterdam)が1件で、多くの遺伝子型が認められた。

加熱用カキは 28 ロット中 13 ロット (46%) からノロウイルスが検出され、生食用と同様に 11 月までは陰性であったが、12 月は 56%、1 月は 100%、3 月は 11% が陽性であった。12 月に検出されたノロウイルスの遺伝子型は G2 に属する C-9 (Lordsdale) が 1 件であった。

食中毒原因あるいは有症カキにおけるノロウイルス汚染は 20 事例の 64 個のカキについて調べたところ、20 事例中 15 事例のカキには 1 個当りノロウイルスが 125 コピー以上に汚染されており、1,000 コピー以上が 8 事例に認められた。4 事例は陽性と即断できないものの 0<~≤60 コピーで、0 コピーは 1 事例に見られたに過ぎなかった。

自生カキからは 6 月～9 月、11、12 月、1、2 月にノロウイルスが陽性となった。

ヒオウギ貝からはノロウイルスが 4 件 (5, 12, 1, 2 月) の全てから検出された。

A 型肝炎ウイルスは生食用カキ 1 ロットでリアルタイム PCR は 10 コピー以下であったが、RT-PCR 法で陽性で、シーケンスで A 型肝炎ウイルスと確認された。

その他は全て A 型肝炎ウイルス陰性であった。

輸入魚介類では 183 件中 17 件 (9%) からノロウイルスが検出された。ノロウイルス陽性は、韓国産アオヤギ 1 件、アカガイ 3 件、アサリ 1 件、タイラギ 2 件、中国産アカガイ 2 件、アサリ 1 件、タイラギ 1 件、ハマグリ 6 件であった。検出された遺伝子型は韓国産アカガイ、タイラギ、アサリから C-10(MX)、

アサリから C-28、C-3 (Winchester)、C-26 であった。

A 型肝炎ウイルスは韓国産アカガイ 1 件 (0.5%) から検出された。その他は全て陰性であった。

E 型肝炎ウイルスは輸入魚介類 50 件および生後 6～9 ヶ月のブタ血清 80 件から RT-PCR 法で検出を試みたが、全て陰性であった。

### 3. 環境中のウイルス汚染実態調査

河川水は 8 月に RT-PCR 法で G2 が陽性 (リアルタイム PCR は陰性) は全て陰性であった。海水は 1 月～3 月に 2 海域が陽性となった。海域でのカキは 1 月～3 月に 4 海域の 5 地点で陽性となった。そのほかの地点でも同時期にリアルタイム PCR で実測値 10 コピー以下のものが多く認められた。海水でノロウイルスが陰性であっても、カキでは陽性が認められた。

養殖カキ筏の海面から上層、中層、下層の養殖部位別のカキ汚染状況を調査したところ、加熱用カキ養殖海域では上層から中層がノロウイルスに汚染される傾向が認められた。しかし生食用カキ養殖海域は上層から下層の全てが陰性で、部位別による汚染を明らかにすることができなかった。外湾と内湾での汚染の違いは河川水の影響を受けやすい外湾で養殖されているカキに汚染されやすい傾向が認められた。海水から検出された遺伝子型は 3 つ認められた。

プランクトンは平成 14 年 1、2 月、6 月がノロウイルス陽性で、平成 14 年 7 月から平成 15 年 2 月の間は陰性であった。

### 4. 食品媒介集団発生状況

カキ関連食中毒 35 件で、主な発生月は 12 月が 8 事例、1 月が 10 事例、2 月

が 9 事例で、喫食者数を完全に調査できた 31 事例の喫食者数は 699 名で発病者は 328 名 (47%) で、1 事例当たりの患者数は 6 名であった。発生施設は殆どが飲食店・旅館であった。患者ふん便 227 件中 154 件 (68%) からノロウイルスが検出され、全ての事例からノロウイルスが検出された。従事者ふん便 154 件中 12 件 (8%)、吐物 1 件中 1 件、カキ 57 件中 11 件 (19%) がノロウイルス陽性であった。患者ふん便から検出された遺伝子型の G1 に属するものは C-3(Winchester) が 6 件、C-6(Chiba) が 3 件、C-2、C-22 (Musgrove)、C-4(Southampton) が各 2 件、C-5(Sindlesham) が C-8、C-21、C-30(NV)、DSV と Stav の中間型が 1 各件、G2 に属する C-10(MX) が 12 件、C-16(Hillingdon) が 8 件、C-9(Lordsdale)、C-11、C-31 (Hawaii) が各 4 件 C-13 (Hawaii)、C-15(SMV)、C-18(Amestergdon)、C-20 (Miami)、C-28 および型別不明が各 1 件と極めて多様であった。

原因食材が非カキによる 44 事例では、11 月が 4 事例、12 月が 12 事例で最も多く、1 月が 4 事例、2 月が 6 事例であった。喫食者数を完全に調査できた 37 事例の喫食者数は 7,244 名で発病者は 2,020 名 (28%) であった。事例当たりの患者数は 46 名と多く、発生場所は料理屋・旅館が 23 のほかに学校が 7、福祉施設等 5、自宅および菓子店 1 で発生している。食中毒患者ふん便 409 件中 280 (68%) 件、従事者ふん便 274 件 44 件 (16%)、吐物 36 件中 16 件 (44%) および食品 108 件中 5 件 (5%) からノロウイルスが検出された。患者ふん便か

ら検出された遺伝子型は G1 に属する C-3(Winchester)、C-6(Chiba) が各 2 件、C-7 (Musgrove)、C-8 が各 1 件、G2 に属する C-9(Lordsdale) が 9 件、C-10(MX) が 8 件、C-15(SMV) が 4 件、C-13 (Hawaii)、C-14 (Hawaii)、C-16 (Hillingdon)、C-18(Amestergdon) が各 2 件、C-20(Miami)、C-31(Hawaii) が 1 件と多様であった。

従事者からは G1 の C-1(Chiba) が 2 件、G2 の C-9(Lordsdale) が 3 件、C-10(MX) が 3 件、C-14 (Hawaii)、C-15(SMV)、C-16 (Hillingdon)、C-31 (Hawaii) が各 1 件であった。吐物は C-16 (Hillingdon) が 1 件、食品はマカロニサラダから C-15(SMV) が 1 件、きな粉パンから C-16 (Hillingdon) が 1 件であった。

食中毒事例のノロウイルス陽性ふん便中に含まれていた 117 件中のウイルス量はふん便 1g 中に 1 億コピー以上存在したのは 34%、100 万から 1 億以下は 40%で、75%以上が 100 万コピー以上であった。発病後日数が 8 から 9 日目でもふん便中に 1 万コピー以上含まれていた。吐物 5 件は 1g 当たり 10 万から 1000 万コピーの間であった。

従事者でノロウイルス陽性の 33 名からのふん便 1g 中に 1 億コピー以上存在したのは 21%、100 万から 1 億コピー以下は 58%で、79%以上が 1 万コピー以上であった。

なお、12 月から 1 月に発生した乳幼児下痢症患者 36 名中 26 名のふん便から検出されたノロウイルスの遺伝子型は G1 に属する C-4 (Southampton) が 1 件、G2 に属する C-9(Lordsdale) が 15 件、C-10(MX)、C-20 (Miami) が各 2

件、C-15(SMV)が1件であった。

乳幼児下痢症患者から主として検出されたC-9(Lordsdale)はカキ、非カキ食中毒事例、従事者から多く検出された。

#### 5. 地図的・時間的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

1999-2001年における集団急性胃腸炎事例と小児の散発性急性胃腸炎について地図情報システム (geographic information system, GIS)を用い検討し、分子疫学的には両疾患の関連性が強く示唆されたが、ウイルスのG1とGII別にした空間的解析においては関連性は示されなかった。

過去20年間のノロウイルス感染症とロタウイルス感染症についてその変遷を検討し、ノロウイルスV感染症のピークは12月と1月と変化は見られてないが、ロタウイルス感染症のピークは、これまでの1, 2月から90年代中間から2, 3月と約1ヶ月間遅延傾向が見られた

#### 6. 下痢原性大腸菌の食品汚染と遺伝子診断法の確立

局在性付着大腸菌では血清型または *eae* 遺伝子型により、病原性に関連する遺伝子に変異または欠損があること、コンタクトヘモリシス法を用いた生物活性は同じ血清型でも異なるものが見られた。また遺伝子型により増菌培地による影響を受けること、分泌タンパクである EspB の発現は生物活性と関連していた。

白菜以外の漬物及び生鮮野菜漬物で

は、腸管出血性大腸菌 0157 と他の病原大腸菌及びサルモネラは全て陰性であった。黄色ブドウ球菌は1件 (小松菜) から検出された。大腸菌は公定法では4件 (9.3%) だけであったが、食中毒検査法では8件 (18.6%) から検出された。セレウス菌は23件 (53.5%) から検出され、分離株の半分以上に下痢性毒素の産生性が見られた

分離株の半分以上に下痢性毒素の産生性が見られた。一方、生鮮野菜からは病原菌は検出されなかったが、*Klebsiella*、*Citrobacter*、大腸菌が検出された。

#### D. 研究考察

##### 1. 検査法の確立

本研究の遂行に際して、食品中のウイルスを定量することを目的としており、昨年度のノロウイルスに用いたプライマーおよびプローブはアルファトロン型が検出できないことが示されたので、アルファトロン型も検出可能なプローブおよびプローブを設定した。本年度は新しいもので本研究を行った。このことにより食品等の汚染数が定量的に捉えられ、量的評価の精度が高くなった。

昨年度は1ロットにつきカキ5個をプールして検査を行ったが、本年度は1ロットから3個についてそれぞれについて検査を行い、カキ1個以上に検査実測値10コピー以上が認められた時にそのロットを陽性とした。カキ1個当たりに換算すると125コピー以上となる。カキ3個について検査を行ったが、同一ロットでも個々で汚染量は様々であり、今後各ロットでの適正な

検査数を定める必要があると考えている。

本年度の市販生食用カキのノロウイルス汚染は12月から認められ、1月は15%、2月は11%にカキ1個当たり125コピー以上が認められた。カキのノロウイルス汚染とカキ養殖海域の海水汚染もほぼ同じ時期であった。また、カキを介する食中毒様集団発生も同時期に多発している。このことから海水およびカキのノロウイルス汚染とカキを介する食中毒発生との関連性が強く認められた。

昨年度の本研究で同一筏のカキにおいてウイルス汚染量は個々で異なっていた。本年度はその問題を解明する目的で、加熱および生食用養殖筏の上層、中層、下層におけるカキのノロウイルス汚染を調査したところ、加熱用筏では上層から中層(海面下7m)で汚染される傾向が認められた。しかし生食用カキ養殖筏では上層から下層までカキが陰性で場所を明らかにすることができなかった。カキ筏で最もウイルス汚染を受けやすい場所を特定することにより、カキの汚染実態を的確に捉えることが可能となり、検査精度が高まるので、今後継続調査して明らかにしたいと考えている。

カキの紫外線照射水による浄化の前後におけるウイルス汚染量の変化に関しても実験を行ったが、浄化前にノロウイルス陰性であったことから、浄化によるウイルス量の変化を明らかにできなかった。

海水20Lの検査で陰性を示しても、カキではノロウイルス陽性が認められた。海水の検査で検出できないウイル

ス量であっても、カキは1時間に10～18L程度海水を吸引しカキの中腸腺でウイルスが濃縮されたと考えられる。今後、海水の検査では海水量の増加、採取する場所(深さ、河川水の流入、海流との関係)等の検討が必要と考えている。プランクトンからノロ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簡便となるので、引き続き研究し、海水汚染との関連性を追求したい。

カキのウイルス学的安全性の確保に関して多くの成果が得られたものの、さらに解決しなければならない問題が多く、来年度はそれらの解決に向けて本研究を遂行したいと考えている。

カキを介さない食中毒事例は11月から見られ、12月が最も多く、その後3月まで発生している。この11月から12月に多発する要因として、この時期の乳幼児下痢症患者から主として検出されたC-9(Lordsdale)が非カキ食中毒事例、従事者から多く検出されことから、乳幼児の間でノロウイルスによる急性胃腸炎が流行し、感染したヒトの便が食品を汚染させることにより発生しているものと推測される。

カキ関連食中毒事例では複数の患者から検出されるノロウイルス遺伝子型は多くの事例で複数検出されたのに対し、非カキ事例(バイ貝事例を除く)は患者および従事者から検出された遺伝子型は一つであった。カキは不特定多数のヒトからのノロウイルスが蓄積さ

れ、それを喫食したヒトで最も増殖しやすいウイルスが排泄されるのに対し、非カキ事例では特定のヒトから食品を汚染させたことにより、検出される遺伝子型は一つであるといえる。カキ事例の従事者からのノロウイルス検出率は 8%に対し、非カキ事例は 16%と約 2 倍であり、非カキ事例の食品汚染させたヒトに従事者も推察される。また、カキ事例はその殆どが飲食店・料理屋・旅館が発生施設で、非カキ事例は飲食店等が半数で、学校、福祉施設等でしばしば発生し、社会的に大きな問題となっている。

ヒトを介する食品汚染の重要な要因として、多くの患者の急性期のふん便 1g 中に 1 億コピー以上にノロウイルスが存在していることである。ノロウイルスは 100 個以下で感染・発病させることが知られており、極めて少量のふん便が食品に付着しても、多くのヒトを発病させる。さらに感染 1 週間後でも大量のウイルスを排泄していた。食中毒防止には下痢症状を有するときのみならず、回復後も 10 日程度はウイルスを排泄していると考え、この間は特に十分な手洗いを行い、直接食品に触れないようにするべきである。

吐物にも多くのウイルスに汚染されており、吐物を処理する時には完全にウイルスを不活化することが感染拡大防止からも重要である。

食品の感染源として、主に東南アジアから輸入されている生鮮魚介類からはノロウイルスが 9%、A 型肝炎ウイルスが 0.5%検出された。わが国では A 型肝炎ウイルスは常在していないと考えられているが、近年は感染源不明（海

外渡航歴なし、周りに A 型肝炎患者が無く、二次感染も考えられない）の患者が 300 名程度発生している。感染源不明の中には食品を介しての感染が考えられており、実際に A 型肝炎ウイルスが食品を介してわが国に侵入してきている。従って、輸入生鮮魚介類は充分に加熱しないと、ノロウイルス、A 型肝炎ウイルスに感染する危険性が高いため衛生教育を広く行わなければならない。

E 型肝炎ウイルスは輸入魚介類およびわが国の生後 6 ヶ月以上のブタ血清には認められなかった。今年度は検査数が少なく、さらに検体数を多くして監視しなければならないと考えている。

また、輸入魚介類から野生ポリオウイルスは検出されなかった。

カキのウイルス学的安全性の確保には 100 コピー以下のウイルスを検出・同定できる検査法の確立、カキ等のロット毎の検査数、河川水と海水汚染、養殖筏におけるウイルス汚染状況の解明等多数の問題を抱えている。

1999-2001年における集団急性胃腸炎事例と小児の散発性急性胃腸炎について地図情報システム (geographic information system, GIS) を用い検討したところ、分子疫学的には両疾患の関連性が強く示唆されたが、ノロウイルスの G1 と G2 別にした空間的解析において関連性は示されなかった。ノロウイルス関連の発生状況調査法、特に集団急性胃腸炎発生において、食中毒に区分されない事例が多数存在によりノロウイルスの全容が不明のまま本疾患

の把握方法の改善が必須であることが明確になった。

過去20年間のノロウイルス感染症とロタウイルス感染症についてその変遷を検討し、ノロウイルス感染症のピークは12月と1月と変化は見られてないが、ロタウイルス感染症のピークは、これまでの1,2月から90年代の中間頃から2,3月と約1ヶ月間遅延傾向が見られた。このことは地球の温暖化による可能性が示唆されたが、更なる検討が必要と思われた。

局在性付着大腸菌では、血清型または *eae* 遺伝子型により、病原性に関連する遺伝子に変異または欠損があること、コンタクトヘモリシス法を用いた生物活性は同じ血清型でも異なるものがあること、また遺伝子型により増菌培地による影響を受けること、分泌タンパクである EspB の発現は生物活性と相関していることが判明した。漬物では、黄色ブドウ球菌は1件（小松葉）から検出された。大腸菌の検出は公定法では検出率が低く、食中毒検査法のほうが優れていた。大腸菌とセレウス菌の検査には問題を有することが示され、簡便で特異性の高い検査法の開発が必要と思われる。

## E. 研究結論

本研究では市販生カキ、輸入生鮮魚介類のノロウイルスおよびA型肝炎ウイルスの汚染状況を明らかにした。

カキ関連食中毒事例における原因食材であるカキにおけるノロウイルス汚染量を調べ、健康被害リスク評価のデータを蓄積している。

養殖海域における海水とカキのノロウイルス汚染との関連性を示し、海水およびカキのノロウイルス汚染とカキ媒介食中毒事例発生との関連性を示した。

食中毒発生要因には生カキのように食品の内部にウイルス汚染しているものと、ヒトを介してウイルスに汚染されたふん便あるいは吐物が食品に付着して起こすものがあり、2つの集団発生様式の相違点を明らかにした。

カキのウイルス学的安全性の確保にはカキ、海水、養殖筏等の検査で解決しなければならない問題が残されている。

## F. 健康危険情報

食品からのウイルス検出状況ならびに集団発生における検査結果は直ちに厚生労働省食品保健部に報告し、常に密接に情報交換と連携しながら研究を遂行している。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。

## F. 行政支援

食品およびふん便からの RT-PCR 法、リアルタイム PCR 法による A 型肝炎ウイルス検査法を開発し、厚生労働省医薬局食品保健部監視安全課から全国の衛生研究所等に通知した。

リアルタイム PCR および RT-PCR 法でアルファトロン型も検出可能なプライマーおよびプローブを設定し、全国の地方衛生研究所ウイルス担当職員に知らせた。

A 型肝炎ウイルスおよびノロウイルス



ス(G1.G2)の RNA 抽出用陽性コントロール、RT-PCR 法における陽性コントロール、リアルタイム PCR 法におけるウイルス DNA 量の標準品を全国の衛生研究所等に配布している。

本研究の班長である西尾は国立保健医療科学院が行っている特別課程ウイルスコースの研修主任を併任しており、11 月開催された平成 14 年度のウイルスコースで小型球形ウイルスの検査法の実習を本研究班員の協力を得て行っている。

## H. 研究業績

### 1. 発表論文

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について、日本臨床、2002、

Fujimoto, T., Chikahira, M., Yoshida, S., Ebira, H., Hasegawa, A., Totsuka, A., and Nishio, O. : Outbreak of Central Nervous System Disease Associated with Hand, Foot, and Mouth Disease in Japan during the Summer of 2000: Detection and Molecular Epidemiology of Enterovirus 71. *Microbiol. Immunol.* 46:621-627. 2002

古田敏彦、竹内寛行、東谷市郎、西尾治：大アサリの喫食を原因とするノーウオーク様ウイルスと A 型肝炎ウイルスによる食中毒事例—浜松市、病原微生物検出情報、23、119-120、2002

藤本嗣人、近平雅嗣、宗村徹也、西尾治、吉田 弘、武田和子、吉田真策：脳症患者の咽頭ぬぐい液および髄液から検出された A 群コクサッキーウイルス—兵庫県、病原微生物検出情報、23、174-174、2002

西尾 治、秋山美穂、長谷川斐子、古屋由美子、大瀬戸光明、杉枝正明：輸入生鮮魚介類からの A 型肝炎ウイルス検出状況、病原微生物検出情報、23、274-275、2002

岡藤輝夫、岡藤隆夫、岡藤みはる、藤本嗣人、近平雅嗣、西尾治：スイミングプールを介したと推定されるアデノウイルス 4 型による咽頭結膜熱の流行。臨床とウイルス、30-4:270-274、2002.

入谷展弘、勢戸祥介、春木孝裕、川本尋義、西尾 治、久保英幸、村上 司、養城昇次、瀧野 薫、小倉 壽：河川水からの Norwalk virus の検出、生活衛生、46、137-143、2002

入谷展弘、勢戸祥介、春木孝裕、西尾治、久保英幸、村上 司、養城昇次、瀧野 薫、綾田 稔、小倉 壽：リアルタイム PCR 法を用いた Norwalk virus 検出法の評価、大阪市立環境科学研究所報告、64、6-10、2002

西尾 治、新川奈緒美：ノーウオーク様ウイルスによる集団発生、日本医事新報 No. 4105、5-9、2002

西尾 治、西 香南子、福田伸治、西

- 田知子、篠原美千代、沖村容子、新川奈緒美、杉枝正明、古屋由美子、大瀬戸光明、鈴木 宏：ウイルス性食中毒の病因、臨床とウイルス、31:(1)、2003 印刷中
- 古田俊彦、秋山美穂、加藤由美子、西尾 治：ノロウイルス（ノーウォークウイルス）A 型肝炎ウイルスに汚染されたウチムラサキ貝による食中毒事例：感染症学雑誌、77、89-94、2003
- 福田美和、川田一伸、矢野拓也、杉山 明、中山 治、西尾 治、関根大正、櫻井悠朗：養殖カキのウイルス浄化試験、感染症学雑誌、77、95-102、2003
- 田中俊光、西尾 治： 輸入二枚貝等からの SRSV 遺伝子検出状況、獣医公衆衛生研究、5、15-17、2003
- 新川奈緒美、永田告治、有馬忠行、本田俊郎、吉國謙一郎、上野伸広、湯又義勝、西尾 治：鹿児島県における海域のウイルス汚染実態調査及びウイルス性胃腸炎集団発生事例、鹿児島県環境保健センター所報、3、102-105、2003
- 近藤玲子、山下育孝、吉田紀美、大瀬戸光明、浅井忠男、井上博雄、西尾治、秋山美穂：愛媛県において 10 月から流行したノーウォークウイルス様ウイルス胃腸炎。病原微生物検出情報、24：9-10、2003
- Adhikary AK, Numaga J, Kaburaki T, Kawashima H, Araie M, Ikeda Y, Ogino T, Suzuki E, Ushijima H, Mukoyama A, Matsuno S, Inada T, Okabe N. : Genetic characterization of adenovirus type 8 isolated in Hiroshima city over a 15 year period. J. Clin. Pathol. 56:120-5、 2003
- .Doan LT, Okitsu S, Nishio O, Pham DT, Nguyen DH, Ushijima H. : Epidemiological features of rotavirus infection among hospitalized children with gastroenteritis in Ho Chi Ming City, Vietnam. J Med. Virol. 69:588-94、 2003
- 鈴木宏、西川眞：ノーウォークウイルス集団食中毒と小児急性胃腸炎の関連性—本邦での歴史を踏まえて—。日本臨床、60:1208-1213、 2002.
- Sugieda, M, Nakajima, S. : Viruses detected in the Cecum Contents of healthy pigs representing a new genetic cluster in genogroup II of the genus Norwalk-like viruses. V. Research. 165-172、 2002
- 杉枝正明、佐原啓二、稲吉 恵、秋山眞人：豚盲腸内容物から検出した NV(SRSV) 遺伝子の全ゲノム（塩基配列）の解析。静岡県環境衛生科学研究所報告。 44, 5-8、2001
- 大瀬戸光明、近藤玲子、山下育孝、吉田紀美、浅井忠男、井上博雄、岡田峰幸、篠崎邦子、石丸啓郎、中野省三：急性胃腸炎における Sapporo Virus の役割。

愛媛県衛環研年報、3:5-9、2002

西 香南子, 杉山明, 中山治: 三重県内における Norwalk virus 動向に関する研究 (2001 年度), 三重保環研年報, 47:41-46、2002

Tetsuo Yoneyama, Akira Sasagawa, Masayuki Kikuchi, Nobuji Noda, Naomi Shinkawa, Kimi Yoshida, Tatsuo Miyamura ; Surveillance of Poliovirus-Isolates in Japan, 2001, JJID, 55, 57-58, 2002

吉田 茂、藍 祥子、今井恵介、三舛信一郎、箆ひとみ、藤本嗣人: 中枢神経系症状を伴う手足口病の臨床的検討、日本小児科学会雑誌、107:473-479、2003.

藤本嗣人、近平雅嗣、増田邦義、宗村徹也、西尾 治、吉田 弘、武田和子、吉田真策: 脳症患者の咽頭ぬぐい液および髄液から検出された A 群コクサッキーウイルス 兵庫県、病原微生物検出情報、23:1、2002

成松浩志、小林貴廣、世古庄太、後藤祐司、木元正一、尾形長彦、瀧 祐一、伊藤健一郎: と畜場に搬入された豚の糞便中におけるペロ毒素産生性大腸菌 (VTEC) の分布と病原性関連因子保有状況調査. 食品微生物学雑誌、19:21-26、2002

小林一寛、伊藤健一郎他: 下痢原性大腸菌における付着因子保有状況とそれに基づく大腸菌検査の一考察. 感染症

学雑誌. 76:911-920、2002

伊藤健一郎、松崎充宏: 腸管出血性大腸菌 0157 の迅速検査法とその成績の取り扱い. 日本臨床. 60:1114-1120、2002

## 2. 学会発表

西尾 治: ウイルス性食中毒の病因、臨床ウイルス学会、第42回日本臨床ウイルス学会、2002.6.6-7、秋田市

Ushijima H, Zhou Y, Okitsu S, Zhu L, Ishihara K, Nishio O. : Molecular epidemiological study of diarrheal viruses in Japan from 1996-2000 and gene analysis of rotavirus serotype G9. 4<sup>th</sup> China-Japan International Congress of Virology , 2002, 26-28, Jun, Kun Ming, China

Ushijima H, Li L, Lan DTP, Okitsu S, Nishio O, Seo, JK, Sim JG. : Molecular epidemiology of adenovirus among children with diarrhea in Japan, Vietnam, and Korea. 36<sup>th</sup> Joint Meeting Conference on Viral Disease, 2002, 16-18, Aug, Matumoto

Doan TPL, Okitsu S, Nishio O, Pham TD, Nguyen HD, Ushijima H. : Epidemiological features of rotavirus infection among hospitalized children with gastroenteritis in Ho Chi Minh City, Vietnam. 1<sup>st</sup> Asian Congress of Pediatric Infectious Disease, 2002, 10-13, Nov. Pattaya, Thailand

H. Ushijima, H. Kono, YM Zhou, DTP Lan, S. Peerakome, N. Maneekarn, S. Okitsu, O. Nishio.: Recent trend of rotavirus infection in Japan, Thailand and Vietnam. VII International Congress of Virology, 2002, July, Paris

A. Kawamoto, N. Matsumoto, T. Hosoi, O. Nishio.: Epidemiology investigation of Norwalk virus detected in humans, environment and oysters. VII International Congress of Virology, 2002, July, Paris

西尾 治：ウイルス性食中毒、第 134 回日本獣医学会学術集会、2002. 9. 19-21、岐阜市

西尾治、秋山美穂、加藤由美子：リアルタイム PCR 法による A 型肝炎ウイルスの検出について、第 76 回日本感染症学会、2002. 4. 11-12、P. 251、東京都

大瀬戸光明、近藤玲子、山下育孝、吉田紀美、杉枝正明、古屋由美子、藤本嗣人、長谷川斐子、加藤由美子、秋山美穂、西尾治：輸入魚介類のウイルス汚染実態調査、第 50 回日本ウイルス学会、2002. 10. 16-18、P. 178、札幌市

古屋由美子、原みゆき、片山丘、今井光信、加藤由美子、秋山美穂、西尾治：イカ塩辛が原因の Norwalk virus による食中毒事例、第 50 回日本ウイルス学会、2002. 10. 16-18、P. 179、札幌市

西田知子、三上稔之、沖村容子、篠原

美千代、西香南子、川本歩、木村博一、杉枝正明、大瀬戸光明、春木考祐、鈴木宏、西尾治：国内産および韓国産カキのノーウォークウイルスおよび A 型肝炎ウイルスの汚染状況、第 50 回日本ウイルス学会、2002. 10. 16-18、P. 179、札幌市

隈元星子、森屋一雄、諸石早苗、伊藤健一郎：散発下痢症患者及び健常乳幼児由来大腸菌における局在性及び凝集性付着大腸菌関連遺伝子の保有状況について（第 2 報）。第 76 回日本感染症学会総会。2002. 4. 東京都

森屋一雄、増本喜美子、隈元星子、藤原義行、山口博之、寺嶋淳、田村和満、渡辺治雄：保育園における腸管出血性大腸菌 O121:H19 の集団事例について。第 6 回腸管出血性大腸菌シンポジウム。2002. 6. 東京都

Ushijima H, Zhou, Y, Okitsu S, Zhu L, Nishio, O. : Molecular epidemiology of rotaviruses, especially G9, in Japan(1999-2000). 1<sup>st</sup> Asian Congress of Pediatric Infectious Disease 2002, 10-13, Nov, Pattaya, Thailand

岡田峰幸、篠崎邦子、大瀬戸光明：Sapporo virus の検出及び分子疫学的解析。第 43 回日本臨床ウイルス学会、2002、6 月、秋田市

藤本嗣人、近平雅嗣、宗村徹也、西尾治、吉田弘：脳炎患者の咽頭拭い液および髄液から検出されたコクサッキー A 群ウイルス、第 50 回日本ウイルス学会、2002. 10 月、札幌市