

藤本嗣人、近平雅嗣、岡藤輝夫、西尾治、吉田弘：兵庫県において 1993 年 10 月～1994 年 10 月に無菌性髄膜炎と発疹症の流行を引き起こしたエコーウイルス 9 型の分子疫学、第 43 回日本臨床ウイルス学会、2002. 6 月、秋田市

宗村徹也、七種美和子、川上千春、野口有三、藤本嗣人、近平雅嗣、吉田弘：近年日本で分離されたコクサッキーウイルス A6 の分子系統学的手法を用いた解析、第 43 回日本臨床ウイルス学会、2002、6 月、秋田市

吉田智子、大内好美、林賢一、横田陽子、藤本嗣人、松浦久美子、山田明、吉田弘：滋賀県で分離されたエコーウイルス 18 型の VP1 および VP4-VP2 領域の遺伝子解析、衛生微生物技術協議会第 23 回研究会、2002. 7、奈良市

勢戸祥介、入谷展弘、名取克郎、武田直和、久保英幸、綾田 稔、小倉 壽、春木孝祐：大阪市内で検出した Alphatron type NV の遺伝子解析および抗原性の解析、第 50 回日本ウイルス学会、2002、10、札幌市

入谷展弘、勢戸祥介、久保英幸、春木孝祐、名取克郎、武田直和、瀬戸俊之、服部英司、綾田 稔、小倉 壽、：乳幼児における Norwalk virus 感染にたいする免疫応答、第 50 回日本ウイルス学会、2002、10、札幌市

勢戸祥介、入谷展弘：リアルタイム PCR 法を用いた NV 検出法の評価、第 14 回ウイルス性下痢症研究会、2002、10、札幌市

入谷展弘、勢戸祥介、久保英幸、村上司、綾田 稔、小倉 壽、春木孝祐、西尾 治：市販生カキからのノーウォークウイルスおよび A 型肝炎ウイルスの検出、39 回近畿地区ウイルス疾患協議会、2003、2、神戸市

## Ⅱ

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 分担研究報告書

平成 14 年度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）

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 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

主任研究者	国立感染症研究所	西尾 治
研究効力者	広島市衛生研究所	野田 衛
	山口県環境保健研究センター	西田 知子
	長野県衛生公害研究所	徳竹 由美
	広島県環境保健センター	福田 伸治
	埼玉県衛生研究所	篠原 美千代
	東京都衛生研究所	林 志直
	宮城県保健環境センター	植木 洋、渡辺 節
	青森県環境保健センター	三上稔之、筒井理華、 石川和子
	北海道立衛生研究所	吉澄 志摩
	鳥取県衛生研究所	川本 歩
	佐賀県衛生薬業センター	安藤 克幸
	群馬県衛生研究所	木村 博一、斉藤美香
	国立感染症研究所	秋山 美穂、山口 卓

研究要旨

市販生食用カキ 398 件中 24 件(6)からノロウイルスが検出され、1 月、2 月が高率であった。12 月から 2 月に得られた加熱用カキは 24 件中 13 件（54%）がノロウイルス陽性であった。

カキ関連食中毒事例と特定された 20 事例の原因食材（同一海域、ロットを含む）について、ノロウイルスの汚染を定量した。20 事例のカキのうち 15 事例（75%）においてカキ 1 個当たり 125 コピー以上の汚染が認められ、そのうち 8 事例が 1000 コピー以上に汚染されていたことから、多くの事例の原因カキ 1 個の中腸腺が感染・発病させるウイルス量に汚染されていた。

## A. 研究目的

ウイルス性食中毒事例はその殆どがノロウイルス (NV) によるものであり、ノロウイルスによる食中毒事例の原因食材はカキ事例が最も多く、カキのウイルス学的安全性の確保が急務となっている。

そこで、市販生カキの NV 汚染状況の把握と実際の食中毒事例における原因食品と推定されたカキ、同一ロットカキあるいは同一養殖地域のカキにおける NV の汚染状況を調べ、カキにおける NV 汚染実態を明らかにする。食中毒様集団発生との関連性を明確にし、将来の生カキにおけるウイルス学的な規格基準作製の基礎資料を得ることを目的としている。

## B. 研究方法

市販生カキは 2002 年 2 月から 2003 年 3 月の間に市販された生食用カキ 398 ロットと加熱用カキ 24 ロットについて NV 汚染状況を調べた。なお、各ロットはカキの中腸腺 1 個あるいは 1g につき、それぞれ 3 件について検査を行った。

検査材料は食中毒様下痢症の集団発生 20 事例のカキ 61 件を用いた。カキの NV 検査にあたり本研究班では検査を統一して行った。その方法の詳細は報告書に掲載してあるので参照されたい。すなわち、各カキから中腸腺を切出し、リン酸緩衝液で 10% 乳剤にし、粗遠心後の上清を超遠心分離して、ウイルスを濃縮した。

カキ濃縮材料からのウイルス RNA の抽出は QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)

を用い、抽出 RNA からの cDNA 合成は Superscript II (Invitrogen) を用いた。RT-PCR の NV 検出プライマーは、genogroup1 (G1) では 1st PCR COG1F/G1SKR→Nested PCR G1SKF/G1SKR、genogroup2 (G2) では 1st PCR COG2F/G2SKR→Nested PCR G2SKF/G2SKR および 1st PCR ALPF/G2ALSKR→Nested PCR G2SKF/G2ALSKR を用いた。リアルタイム PCR は、G1 ではプライマー: COG1F/COG1R、プローブ: RING1-TP (A), RING1-TP (B)、G2 ではプライマー: COG2F, ALPF/COG2R、プローブ: RING2AL-TP を用いて行った。リアルタイム PCR によるウイルス RNA 定量値 (コピー数) は、カキ中腸腺 1 個当たりあるいは 1g 当たりのコピー数で示した。

## C. 研究成績

1) 市販生食用カキにおける月別汚染状況 (表 1)

リアルタイム PCR の検査で、検査実数が 10 コピー以上を示したものを陽性と判断した。今回の統一した検査法では検査の途中で検査材料が 12.5 倍に希釈されるので、カキ 1 個あるいは中腸腺 1g 当たりのコピー数が 125 以上となったものを陽性とした。なお、各ロット 3 件について検査を行い、最も高い値をそのロットにおける NV 量とした。また G1 と G2 が同一のカキから検出された時には合計をそのカキにおける NV 量とした。

10 月および 11 月に買い上げた生食用カキからは NV が検出されなかった。しか

し、12月～3月の間では4～11%のカキに125コピー以上の汚染が認められた。さらに1000コピー以上の汚染が7ロット(2%)に認められた。なお、 $0 \leq \sim < 125$ の間のものが90ロット(23%)に見られた。

生食用カキから検出されたNVの遺伝子型は、11月ではG1のC-13(類似標準株:Chitta)が1件、12月ではG2のC-9(Lordsdale)が2件、1月のG1ではC-4(Southampton)が1件、C-6(Chiba)が4件、G2ではC-16(Hillingdon)が1件、C-18(Amsterdam)とC-20(Miami)が各2件、2月はG1のC-5(Sindlesham)が1件検出された。

## 2) 加熱用カキにおける月別汚染状況 (表2)

加熱用カキは2002年12月から2003年2月の間に得られた24件についてNV汚染を調べたところ、13件(54%)に125コピー以上のNV汚染が認められ、1000コピー以上のNV汚染が3ロット(13%)存在した。

検出された遺伝子型は12月にG2のC-9(Lordsdale)が1件検出された。

表1 生食用カキにおける月別NV汚染状況

採取年月	検査数	陽性数 (%)	リアルタイムPCR コピー数(1個)						
			0	0< ~ <60	60≤ ~ <125	125≤ ~ <300	300≤ ~ <500	500≤ ~ <1000	1000≤
02年2月	8	0	1	6	1				
02年3月	8	2 (25)	4	2		2			
02年4月	2	0	2						
02年10月	23	0	21	2					
02年11月	64	0	59	5					
02年12月	92	4 (4)	71	13	4		2	1	1
03年1月	119	11 (9)	81	22	5	3	2	2	4
03年2月	73	6 (8)	40	22	6	3	1		2
03年3月	9	1 (11)	5	3		1			
計	398	24 (6)	284	74	16	9	5	3	7

表2 加熱用カキにおける月別 NV 汚染状況

採取月	検査数	陽性数 (%)	リアルタイム PCR コピー数 (1個)						
			0	0< ~ <60	60≤ ~ <125	125≤ ~ <300	300≤ ~ <500	500≤ ~ <1000	1000≤
02年12月	8	5 (63)	1		2	2			3
03年1月	7	7 (100)				4	2	1	
03年2月	9	1 (11)	5	3		1			
計	24	13 (54)	6	3	2	7	2	1	3

3) 食中毒事例の原因食材カキにおける NV 汚染状況 (表3)

食中毒 20 事例における原因食材(同一ロット、同一海域のものを含む)としてのカキ 1 個当たりの NV 量は、同一事例で複数のカキについて検査を行ったものでは最も NV 量が多いものをその事例の NV とした。また、G1 と G2 の両方にウイルスが認められたときには、その合計をカキにおける NV 量として表した (表3)。

20 事例のうち最もウイルス量が多かったのはカキ 1 個当たり 1000 コピー以上に汚染されていた 8 事例、125 ≤ ~ < 300 コピーから 500 ≤ ~ < 1000 コピーが各 2 ~ 3 事例で、0 < ~ ≤ 60 コピーが 4 事例、NV が陰性であったのは 1 事例に過ぎなかった。検出された NV の遺伝子型は事例 5 では G1 の C-4 (Southampton)、事例 11、12、13、14 では G2 の C-10 (MX)、事例 15 では G2 の C-9 (Lordsdale)、事例 16 では G2 の C6 (Chiba) と C-20 (Miami)、事例 17 では G2 の C-9 (Lordsdale) と C-10 (MX)、事例 20 では G2 の C-9 (Lordsdale) が検出された。

D. 研究考察

市販生食用カキの NV 汚染は 12 月 ~ 3 月に認められ、この期間では 4 ~ 11% にカキ 1 個当たり 125 コピー以上を検出した。またこの時期にカキによる食中毒様集団発生が多発しており、カキの NV 汚染と食中毒様集団発生との関連性が強く示唆された。昨年度の調査ではこの期間の NV 汚染カキは約 20% に認められたが、今年度はそれよりも低かった。さらにカキ 1 個あたりの NV 汚染が 0 < ~ < 125 コピーを示したものは 23% に見られ、これらが、完全に陰性といえなく、今後このようにリアルタイム PCR で低い値を示したものについての判定基準を作成しなければならないと考えている。

加熱用カキでは 12 月から 2 月の間に半数以上にカキ 1 個当たり NV が 125 コピー以上存在しており、1000 個以上の汚染も 13% に認められた。しばしば加熱用カキを生で食して食中毒事例を起こしており、加熱用カキは生食しないように教育・指導しなければならない。

本検査では 125 コピー以上を陽性とし

て、原因食材についてみると、20 事例中 15 事例の原因食材としてのカキが NV 陽性であった。一般的に NV は 100 個以下で感染・発病すると言われていたことから、今回の食中毒事例のカキでは 1 個で発病するウイルス量に汚染されていたことになり、この 15 事例はカキが原因食として特定されると考えられる。また 4 事例は  $10 \sim 125 \leq$  コピーの間であり、必ずしも陰性とは言えないもので、この値を示したものの中には NV 陽性も含まれていると推測され、少数のウイルスも定量が行えるようにさらに検査感度・精度を向上させなければならないと考えている。

食中毒原因カキから検出された遺伝子型では C-10 が 4 事例から検出されたが、この遺伝子型は日本では一般的によく見られるものである。C-9 は今年、乳幼児の間で流行した NV であり、それがカキに蓄積されたものと考えられる。そのほかに C-4、C-20 が見出されているが、これらは市販カキからも検出された。

## E. まとめ

市販生食カキ、加熱用カキにおけるノロウイルス汚染を調べた。生食カキは 6%、加熱用カキは 54%が汚染されていた。カキ関連食中毒事例原因カキの 75%にノロウイルス汚染が認められた。

## F. 研究発表

### 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

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

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

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)と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(2)、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(2)、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(3)、15-17、2003

## 2. 学会発表

H. Ushijima, L. Li, H. Shimizu, T. P. Lan, S. Okitsu, O. Nishio, J. K. Seo, J. G. Sim. :Molecular epidemiology of adenovirus among children with Diarrhea in Japan, Vietnam and Korea. The Japan-United states Cooperative Medical Science, July. 16-28, 2002 P11, Matumoto, Japan

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 , 26-28, Jun, 2002, 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, 16-18, Aug, 2002, 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, 10-13, Nov. 2002, 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

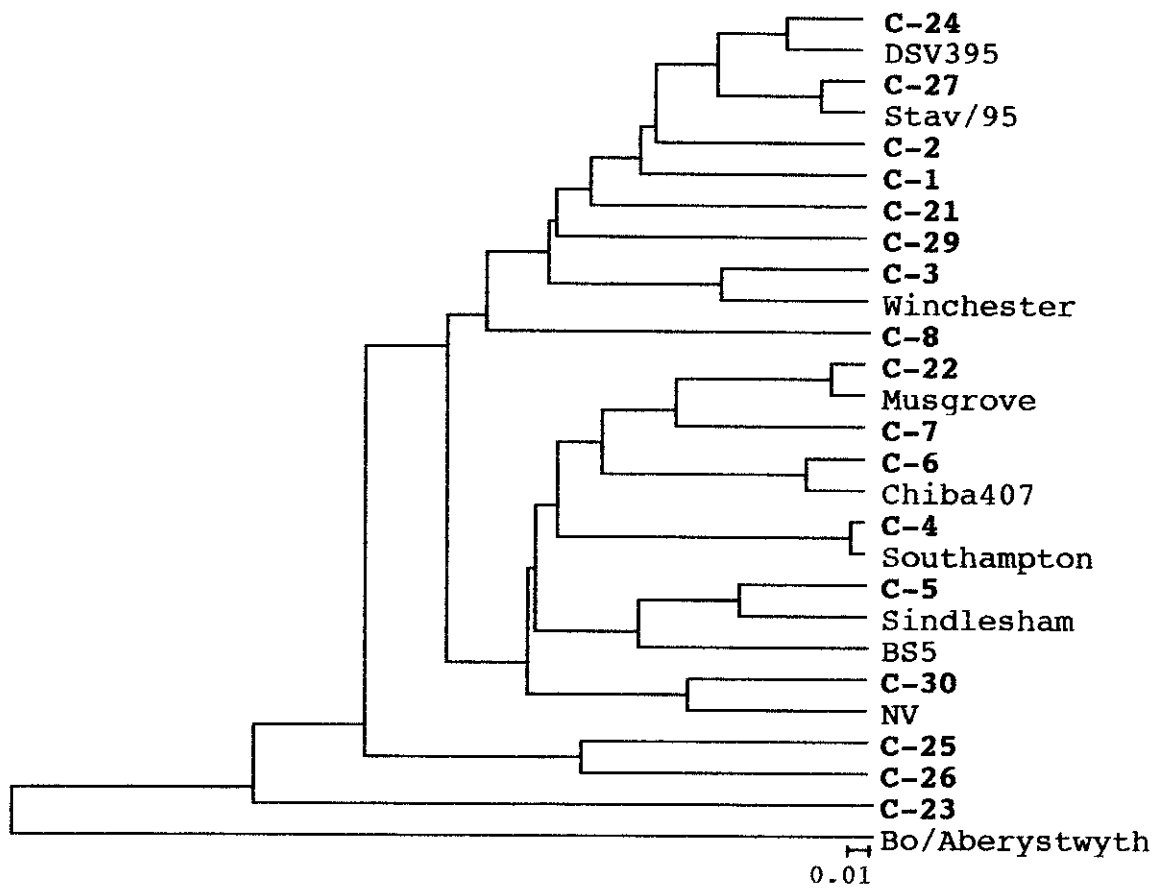


図1. ノロウイルスG1系統樹 (UPGMA法)

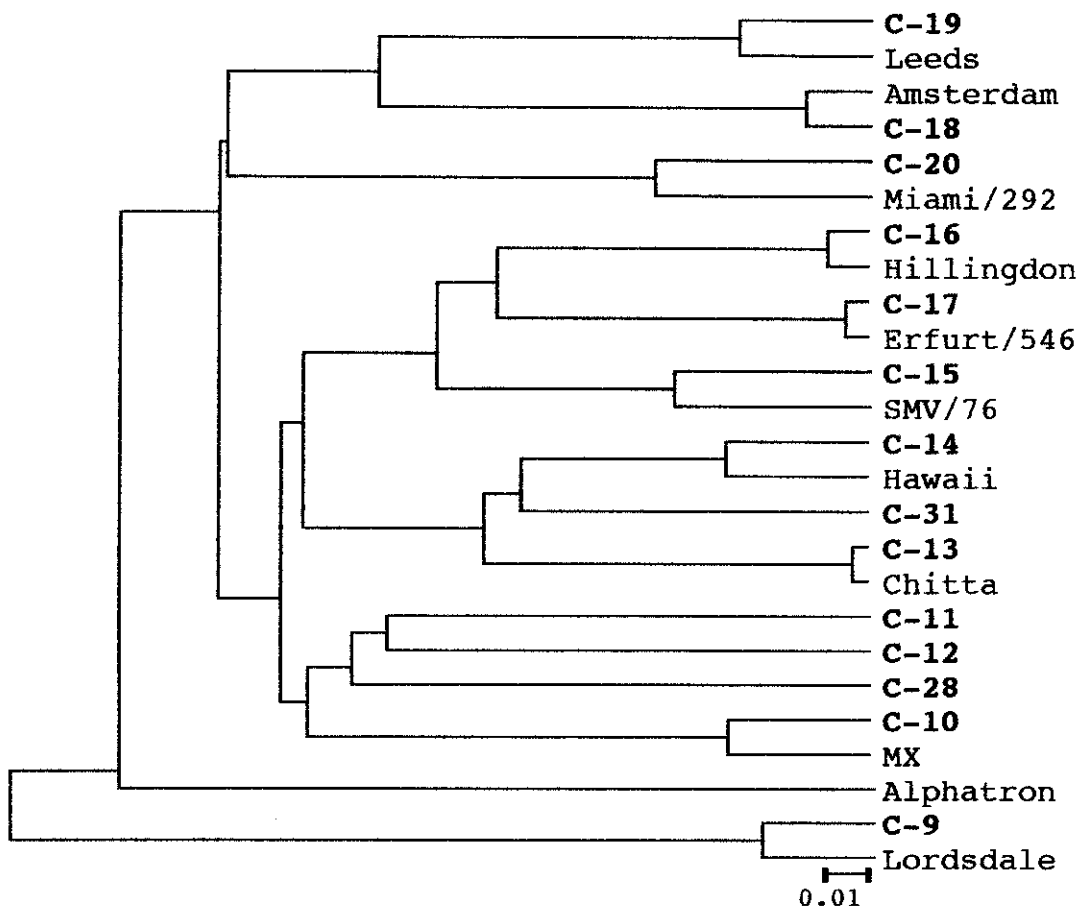


図2. ノロウイルスG2系統樹 (UPGMA法)

平成 14 年度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）  
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 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に関する研究

研究協力者 野田 衛 広島市衛生研究所  
主任研究者 西尾 治 国立感染症研究所

研究要旨

2002 年 12 月から 2003 年 2 月に採取した市販カキのノロウイルス (NV) 及び A 型肝炎ウイルス (HAV) の汚染状況を調査し、ウイルス学的安全性を評価した。定量 PCR 法で供試 41 ロット 123 検体のうち、21 ロット (51.2%)、34 検体 (27.6%) から 100 コピー/個以上の NV 遺伝子が検出され、そのうち 7 ロット (17.1%)、8 検体 (6.5%) は 1000 コピー/個以上の NV 遺伝子が検出された。HAV は 1 検体が低値を示した以外、すべて陰性であった。生食用カキは加熱調理用カキと比較し、NV 汚染率、NV 汚染量とも少ない傾向を示したが、明瞭な違いは認められなかった。カキにおける G1 及び G2 検出の有無及びそれぞれの定量値に関連性が認められた。NV 汚染率及び NV 汚染量に経時的変化が観察された。同一ロットに含まれるカキの NV 汚染レベルは約半数のロットで  $10^2$  オーダー以上の差が認められた。胃腸炎集団発生に関連したカキの NV 汚染量は市販カキの NV 汚染レベルの範囲内であった。

A. 研究目的

カキ等を介したノロウイルス (NV、ノーウォーク様ウイルス) による胃腸炎集団発生の多発や輸入二枚貝の A 型肝炎ウイルス (HAV) 汚染による肝炎発生の危惧など、近年食品媒介性ウイルス感染症による健康被害が社会問題となっている。NV 性胃腸炎集団発生の原因食品として最も重要とされているカキは、現在養殖海域の細菌学的基準に基づき、生食用と加熱調理用に区分され販売されているが、両者のウイルス学的な安全性についてはこれまであまり比較検討されていない。本研究では市場に流通しているカキについて NV および HAV の汚染状況を調査し、生

食用カキと加熱調理用カキとのウイルス学的安全性を評価した。また、胃腸炎集団発生に関連したカキの検査結果と比較解析するとともに、検査上の問題点について考察を加えた。

B. 研究材料と方法

2002 年 12 月から 2003 年 2 月に 2 食料品店 (3 製造業者) で購入した生食用カキ 24 ロット (包装パック) 72 検体、加熱調理用カキ 17 ロット 51 検体、計 41 ロット 123 検体 (1 ロットにつき 3 個) 及び胃腸炎集団発生 4 事例に関連したカキ 6 検体について検査を行った。各カキから中腸腺を切出し、PBS (-) で 10% 乳剤にした後、粗

遠心後の上清を超遠心分離しウイルスを濃縮した。QIAamp Viral RNA Mini Kit(Quiagen)を用い濃縮材料からウイルス RNA を抽出し、DNAse 処理した後、Superscript II (GibcoBRL)を用い cDNA を合成した。NV 検出は COG1F/G1SKR→G1SKF/R, COG2F/G2SKR→G2SKF/R を用いた nested PCR(N-PCR)及び COG1F/COG1R(プローブ: RING1-TP(A), RING1-TP(B)), COG2F/COG2R(プローブ: RING2-TP)を用いた real time PCR(R-PCR)で、HAV 検出は HAV+449/HAV-557(プローブ: HA+482-P-TET)を用いた R-PCR で行った。R-PCR によるウイルス RNA 定量値(コピー数)は全てカキ中腸腺1個当たりのコピー数で示した。NV 陽性の一部について PCR 産物を用いてカプシド領域の塩基配列を決定した。また、全ての供試ロットのカキ残品を通常の調理法でカキフライに調理後喫食し、発症の有無を調査した。

### C. 研究成績

#### 1) 市販カキの NV 及び HAV 汚染状況

市販カキ 41 ロットのうち、NV 検出 R-PCR で NV 遺伝子 1 群(G1)及び NV 遺伝子 2 群(G2)に対し 3 個とも全て 0 コピー/個を示したのは 4 ロット(9.8%)で、他の 37 ロット(90.2%)は 3 個のカキのいずれかが G1 あるいは G2 に対し 6.6 コピー/個以上の値を示した。カキ個別にみると、G1 及び G2 ともに 0 コピー/個を示した個体は 123 検体中 30 検体(24.4%)で、他の 93 検体(75.6%)は G1 あるいは G2 に対し 0.085 コピー/個以上の値を示した。そのうち 100 コピー/個以上の NV 遺伝子が検出されたのは 21 ロット(51.2%)、

34(27.6%)検体、1000 コピー/個以上の NV 遺伝子が検出されたのは 7 ロット(17.1%)、8 検体(6.5%)であった。ロットごとの G1 あるいは G2 の定量値分布(各ロットの最大値を用いた)を表 1 に、カキ個体ごとの分布を表 2 に示した。これらのうち N-PCR で陽性となったのは 4 ロット 4 検体(G1:3 検体, G2:3 検体)で、いずれも定量値 305 コピー/個以上の検体であった。HAV については 37 ロット 110 検体について検査した結果、1 検体が 8.1 コピー/個の低値を示した以外、109 検体は 0 コピー/個であった。

全てのロットのカキ残品をカキフライに調理し 1 家族 3 名で喫食したが、下痢、嘔吐、発熱等の症状を呈することはなかった。

#### 2) 同一ロット中の各カキの NV 定量値分布

同一ロットのカキ 3 個における NV 定量値分布をみると(表 3)、G1 あるいは G2 の定量値が 3 個とも同じレベルであったのは延 82 ロット中 19 ロット(23.2%)、1 個のレベルが異なるのは 39 ロット(47.6%)、3 個ともレベルが異なるのは 24 ロット(29.3%)であった。0(定量値 1 未満)、 $10^0$ (1~<10)、 $10^1$ (10~<100)、 $10^2$ (100~<1000)、 $10^3$ (1000~)の 5 レベルでみると、最大値と最小値との差が  $10^1$  オーダー以内であったのは 42 ロット(51.2%)、 $10^2$  オーダー以上は 40 ロット(48.8%)で、そのうち 16 ロット(19.5%)は  $10^3$  オーダーの差が認められた。1000 コピー/個以上の NV に汚染したカキが含まれていた 9 ロットのうち、5 ロットは

NV 陰性(0 コピー/個)のカキも含まれていた。

### 3) 同一カキ中の G1 定量値と G2 定量値の相関性

同一カキ個体における G1 定量値と G2 定量値は、G1 陰性(0 コピー/個)G2 陰性、G1 陽性(0 コピー/個以外)G2 陰性、G1 陰性 G2 陽性、G1 陽性 G2 陽性の 4 群に大別され、G1 と G2 が陽性の検体では G1 定量値が高くなると G2 定量値も高くなる傾向を示した(図 1)。相関係数は全体(N=123)で  $r=0.78$ 、G1 と G2 が陽性の検体(N=67)で  $r=0.77$  であった。

### 4) 生食用カキと加熱調理用カキとの NV 汚染状況の比較

生食用カキ(72 検体)と加熱調理用カキ(51 検体)に区分し NV 汚染状況を比較した(表 4)。G1 及び G2 の定量値がともに 0 コピー/個を示したのは生食用カキが 22 検体(30.6%)、加熱調理用カキが 8 検体(15.7%)であった。一方、G1 または G2 の定量値のいずれかが 0 を越えたのは生食用カキが 50 検体(69.4%)、加熱調理用カキが 8 検体(84.3%)で、そのうち 100 コピー/個以上は生食用カキが 18 検体(25.0%)、加熱調理用カキが 16 検体(31.4%)、1000 コピー/個以上は生食用カキが 4 検体(5.6%)、加熱調理用カキが 4 検体(7.8%)であった。また、それぞれから検出した G1 あるいは G2 の定量値の平均値及び最大値はすべて加熱調理用カキが高い値を示した(表 5)。

月別の汚染状況をみると(表 5)、12 月前半からすでに NV 汚染が認められ、加熱

調理用カキは 12 月後半、生食用カキは 1 月前半が汚染量のピークとなり、それ以降減少傾向を示し、2 月前半まで汚染が継続した。1 月後半採取の加熱調理用カキ 9 検体はすべて 1 コピー/個以上の値を示した。

### 5) 養殖海域別の NV 汚染状況

供試カキの包装パックに表示されている養殖海域(7 海域)に区分し、月別の NV 検出状況を比較した(表 6)。生食用カキの多くは近接する 3 湾(MT, KR, HR)のもの、加熱調理用カキは HS 湾または HS 県海域のものであった。生食用で多く検査された KR 湾産及び HR 湾産のカキの NV 定量値を月別にみると、両者とも 1 月前半をピークとし、ほぼ同じ汚染状況を示した。一方、加熱調理用の HS 湾産及び HS 県海域産のカキの NV 定量値は、両者とも 12 月後半をピークとした。

### 6) 胃腸炎集団発生に関連するカキ等の検査結果

胃腸炎集団発生 4 事例に関連したカキ 6 検体すべてから 209.6 コピー/個～1777.9 コピー/個の G2 を検出した(表 7)。N-PCR では事例 2 の原因食と推定されたカキから G1(Southampton 類似株)が検出されたが、R-PCR での G1 定量値は極めて低い値(1.2 コピー/個)であった。

## D. 研究考察

市販カキ 41 ロット 123 検体について NV 及び HAV の汚染状況について調査した。NV では、汚染がほぼないと考えられるもの(定量値 0 コピー/個)は 4 ロット

(9.8%), 30 検体(24.4%), 逆に汚染がほぼ確実と考えられるもの(定量値 100 コピー/個以上)は 21 ロット(51.2%), 34(27.6%)検体であり, 市販カキの多くが NV に汚染していることが明らかになった。さらに 1000 コピー/個以上の高濃度 NV が 7 ロット(17.1%), 8 検体(6.5%)から検出された。一方, HAV については 37 ロット 110 検体について検査した結果, 1 検体が 8.1 コピー/個の低値を示した以外はすべて 0 コピー/個であり HAV 汚染はほぼないものと考えられた。

生食用カキと加熱調理用カキの NV 汚染状況を比較した結果(表 4, 表 5), 汚染率, 汚染量などいずれの比較項目においても生食用カキの NV 汚染が少ない傾向を示したものの, 明らかに汚染程度が少ないと結論できる違いは認められなかった。このことは, 生食用カキは非加熱での喫食を許可していることから, NV 感染による健康被害発生の危険度はむしろ生食用カキの方が高いことを示唆している。ただしこの結果は, 生食用カキあるいは加熱調理用カキとして販売されていたものの検査結果であり, それぞれの養殖海域の NV 汚染を必ずしも比較しているものではない。

NV 汚染の経時変化をみると, 汚染率及び汚染量ともに明確な消長が観察された(表 5)。すなわち, 12 月前半ですでに NV 汚染が認められ, 生食用カキでは 1 月前半, 加熱調理用カキでは 12 月後半をピークとした後, 以降減少傾向を示し, 2 月前半まで汚染が継続した。G1 と G2 の汚染状況はほぼ類似した経時変化を示した。生食用カキと加熱調理用カキとで汚染ピー

ク時期に差が認められたのは, 両者の養殖海域での汚染時期の違い(表 6)によると考えられる。

同一ロットのカキ 3 個における NV 定量値の分布を調べた結果(表 3), それぞれのカキの NV 定量値に  $10^1$  オーダー以上の差が 75%に,  $10^2$  オーダー以上の差が約半数に認められ, さらに 1000 コピー/個以上の NV 汚染カキが含まれていた 9 ロットのうち, 5 ロットは NV 陰性(0 コピー/個)のカキも含まれており, 同一ロット内のカキの NV 量に個体差があることが明らかになった。このことは, 市販カキの NV 汚染調査あるいは集団胃腸炎発生時の食品検査の場合複数のカキについて検査を行う必要があることを示しており, 簡便化のためには少なくとも 3 個程度のカキを混合し検査することが有用と思われる。さらにこのことはカキを原因とする胃腸炎集団発生において, カキを喫食しているにもかかわらず発症しない例があることの宿主以外の要因の一つと考えられる。

胃腸炎集団発生に関連したカキ 6 検体について検査した結果, すべての検体から 200 コピー/個を越える NV が検出されたが(表 7), この汚染量は市販カキの汚染レベルの範囲内にあり(表 5), 特に高い値ではなかった。一方, 今回検査した市販カキの残品にもほぼ同程度の NV 汚染があると考えられるが, すべてのロットの残品をカキフライに調理し 1 家族 3 名で喫食した結果, 下痢, 嘔吐, 発熱等の症状を呈することはなかった。今回の調査結果は NV の遺伝子を検出したものであり, 必ずしも感染性ウイルスの存在を示すものではない。しかし, 一般的に 1 本鎖 RNA

は自然界に広く分布する RNA 分解酵素の作用を受けやすく、RNA の検出はウイルスが Virion の形態を保持していると考えられることから、遺伝子検出と感染性ウイルスの存在はある程度相関するものと思われる。以上のことは、NV に汚染している場合でも適切に加熱調理して喫食すれば NV 感染の多くは防止できること、逆に市販カキの多くは未加熱あるいは加熱不足で喫食した場合、胃腸炎を発症する危険性があることを示唆している。

胃腸炎集団発生に関連したカキ 1 検体から N-PCR で G1 (Southampton 類似株) が検出されたが、R-PCR による G1 定量値は 1.2 コピー/個と極めて低値を示した。同時期に別のカキから本例と同じ塩基配列を示す株が検出されており (未発表データ)、その G1 定量値も 0.9 コピー/個と極めて低値であった。これらの結果は、それらの NV 株は R-PCR で使用するプライマーで検出困難な株の可能性があること、さらにそのような株の場合定量値が実際の汚染量と乖離する可能性があることを示唆しており、詳細な検討が必要である。

R-PCR で PCR 反応系当たり 10 コピー以下の低定量値の場合、結果の再現性に問題があることが指摘されている。しかし、月別 NV 検出状況をみると (表 5)、NV 汚染が低い時期で低値を示す検体が多く、NV 汚染が高まるとその割合が低下する傾向が認められ、低定量値は少ないウイルス量を反映しているものと思われた。このことから、R-PCR で低値を示した場合、個別の検査結果については、慎重に取り扱う必要があるものの、疫学的にはその定量値は意義を持つと考えられ、さらなる

データの蓄積が必要である。

一般に、食中毒等の病原体検査により食品を感染源に特定するためには、食品から患者と同一の病原体が検出されることが必要である。しかし、従来からカキ関連胃腸炎集団発生では検出 NV の遺伝子型が原因カキと患者あるいは患者間で異なることが多いとされ、このことは、カキからは汚染量が多くかつプライマーとの相同性が高い NV が検出され、患者からは感染が成立し、体内で増殖した株が検出された結果と考えられている。今回の調査においても、事例 2 で推定原因カキ及び患者 2 名から N-PCR で G1 が検出されたが、その遺伝子型はカキ由来が Southampton 類似株、患者由来では 1 株が Chiba 類似株、1 株が Sindlesham 類似株で、いずれも異なる遺伝子型であった (データ示さず)。さらに、事例との関連が認められていないカキから、推定原因食品と同じ塩基配列を持つ NV がほぼ同時期に検出され (上述)、同一カキ個体の G1、G2 別の検出結果から NV 汚染を受けたカキの多くは複数の NV を保有していることが示唆された。以上のことは、現在原因食品の特定に利用されている分子疫学的解析法 (食品と患者から同じ遺伝子型の病原体の検出することにより当該食品を原因食品と考える方法) はカキと NV との間では適用が困難であることを意味している。一方、食品からの病原体検出は、原因となった病原体が通常は同種の食品中に存在しないことが前提となるが、存在する場合は通常より多いレベルで検出されることが必要となる場合が多い。今回の調査において、市販カキの多くから NV が検

出され、胃腸炎関連カキの NV 汚染量は市販カキの汚染レベルの範囲内であった。また事例 2 では患者及びカキから N-PCR で G1 が検出されたにも関わらず、R-PCR での G1 定量値は極めて低く、逆に G2 定量値が高い結果であった。これらのことは、胃腸炎集団発生の原因となるカキの NV 量は、通常の NV 汚染カキにおける汚染量と比較し特に高いわけではないことを示唆している。以上のことから、現在カキを病原体検査側から原因食品と厳密に特定することは極めて困難であり、今後、そのための新しい手法の開発やアプローチが必要である。一方、喫食等の聞き取りに基づく疫学調査が重要なのは言うまでもなく、その際、食品及び患者由来株の遺伝子型に多様性が認められることが逆にカキが原因食品の可能性があると捉え、疫学調査の解析を行うことも必要と思われる。

## E. 結論

市販カキのノロウイルス (NV) 及び A 型肝炎ウイルス (HAV) の汚染状況を調査した結果、多くの検体から NV 遺伝子が検出され、市販カキの多くは NV に汚染していることが示された。HAV 汚染は極めて少ないものと考えられた。生食用カキは加熱調理用カキと比較し、NV 汚染率、NV 汚染量とも少ない傾向を示したが、生食による NV 感染の危険性は排除できなかった。多くのカキから G1 及び G2 の NV が同時検出され、それぞれの定量値に関連性が認められた。NV の汚染率及び汚染量に経時的変化が観察された。同一ロットに含まれるカキの NV 汚染レベルは、個体ごとに差が認められた。胃腸炎集団発生関連カキの NV 汚染量は市販カキの NV 汚染レベルの範囲内であった。



表1 ロット別検査結果

NV定量値	G1		G2		HAV
	R	N(+)	R	N(+)	R
0	8		5		36
0<~<1	2		0		
1~<10	8		1		1
10~<100	12		14		
100~<1000	9 (2)		14 (1)		
1000~	2 (1)		7 (2)		
計	41		41		37
平均	192.2		354.1		
最大	2612.5		2606.3		

R: Real time PCR

N(+): nested PCR で陽性となった検体数

表2 個体別検査結果

NV定量値	G1		G2		HAV
	R	N(+)	R	N(+)	R
0	54		32		109
0<~<1	12		4		
1~<10	17		5		1
10~<100	24		48		
100~<1000	13 (2)		26 (1)		
1000~	3 (1)		8 (2)		
計	123		123		110
平均	86.15		176.4		
最大	2612.5		2606.3		

R: Real time PCR

N(+): nested PCR で陽性となった検体数

表3 同一ロットに含まれる各カキの NV 定量値分布

同一ロットのカキの NV定量値	延ロット数 (%)	延ロット数	NV定量値(カキ中腸腺1個当たりのコピー数)					
			0	0<~<1	1~<10	10~<100	100~<1000	1000~
3個とも同じレベル	19 (23.2)	13	●●●					
		6				●●●		
1個が異なるレベル	39 (47.6)	1	●●	●				
		5	●●			●		
		1	●	●●				
		4	●		●●			
		7	●			●●		
		4	●				●●	
		1	●					●●
		2		●●	●			
		1			●●	●		
		1			●	●●		
		1			●		●●	
		5				●●	●	
		4				●	●●	
		1				●		●●
1					●●	●		
3個とも異なるレベル	24 (29.3)	3	●	●	●			
		3	●	●		●		
		1	●	●			●	
		3	●		●	●		
		4	●			●	●	
		1	●			●		●
		3	●				●	●
		2		●		●	●	
		2			●	●	●	
		2				●	●	●

ロット数はG1及びG2各41ロットの合計(延82ロット)の集計。

●は定量結果が各定量値レベルの範囲内にあったカキ1個を示す。

図1 カキにおける G1 定量値と G2 定量値の相関  
 定量値 0 コピー/個は 0.001 として作図した。  
 全体(N=123)の相関係数は r=0.78。  
 G1 と G2 が陽性の検体(N=67)の相関係数は r=0.77。

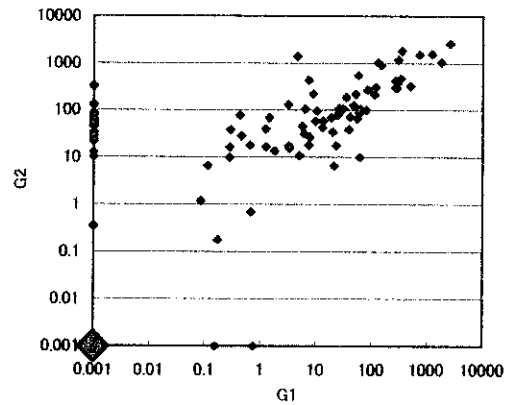


表4 生食用カキと加熱調理用カキとの NV 汚染状況の比較

NV定量PCRの結果	意義	生食用(N=72)		加熱調理用(N=51)	
		件数	%	件数	%
G1T=0 かつ G2T=0	NVの汚染がほぼない	22	30.6	8	15.7
G1T>0 または G2T>0	NVの汚染が疑われる	50	69.4	43	84.3
G1T≥100 または G2T≥100	NVに汚染している	18	25.0	16	31.4
G1T≥1000 または G2T≥1000	高濃度のNVに汚染している	4	5.6	4	7.8

G1T(G2T):G1(G2)の定量値

表5 生食用/加熱調理用区別、月別 NV 汚染状況

区分	NV定量値	12月前		12月後		1月前		1月後		2月前		計	
		G1	G2	G1	G2	G1	G2	G1	G2	G1	G2	G1	G2
生食用 N=72	0	23	16	7	1	4	3	1	1	2	2	37	23
	0<~<1	1	1	1						4	1	6	2
	1~<10	2				1		2		3	1	8	1
	10~<100	1	7	6	9	2	3	4	4		5	13	28
	100~<1000		2	1	5	4	3	2	4			7	14
	1000~		1			1	3					1	4
	平均	0.9	92.5	47.8	111.7	300.6	451.9	82.5	149.9	1.0	10.4	70.9	153.3
最大	13.0	1399.9	500.6	325.0	1806.3	1833.8	293.8	423.8	3.3	21.4	1806.3	1833.8	
加熱調理用 N=51	0	4	3	6	2	4	1			3	3	17	9
	0<~<1	2				1	2			3		6	2
	1~<10	3			1		1	3		3	2	9	4
	10~<100		4	4	5	3	3	4	5		3	11	20
	100~<1000		2	3	3	1	2	2	4		1	6	12
	1000~			2	4							2	4
	平均	2.0	59.4	306.2	552.6	51.9	77.1	44.9	105.9	1.4	20.5	107.8	208.6
最大	9.0	221.5	2612.5	2606.3	271.0	296.3	120.1	304.8	7.5	131.8	2612.5	2606.3	

表7 胃腸炎集団発生に関連したカキの検査結果

事例	検査受付日	R-PCR		N-PCR	備考
		G1	G2		
1	1月17日	19.5	1088.2	陰性	
2	2月13日	1.2	1777.9	G1(Southampton 類似株)	原因食と推定されたカキ残品 翌日のカキ残品
		0	656.1	陰性	
3	2月18日	11.9	245.8	陰性	
		0	209.6	陰性	
4	2月24日	0	284.2	陰性	

表 6 養殖海域別, 月別 NV 汚染状況

養殖海域	区分	NV定量値	12月前		12月後		1月前		1月後		2月前		計	
			G1	G2	G1	G2	G1	G2	G1	G2	G1	G2	G1	G2
MT湾	生食用 N=3	0			2								2	0
		0<~<1											0	0
		1~<10											0	0
		10~<100			1	1							1	1
		100~<1000				2							0	2
		1000~											0	0
		平均			28.5	141.7							28.5	141.7
最大			85.6	267.5							85.6	267.5		
KR湾	生食用 N=27	0	9	9	4	1	3	2			1		17	12
		0<~<1			1						1		2	0
		1~<10									1		1	0
		10~<100			4	7	1	2				3	5	12
		100~<1000				1	2	1					2	2
		1000~						1					0	1
		平均	0.0	0.0	8.8	74.8	185.1	348.3			1.2	18.3	44.1	104.4
最大	0.0	0.0	24.3	311.3	733.1	1505.0			3.3	21.4	733.1	1505.0		
HR湾	生食用 N=24	0	10	6	1		1	1			1	1	13	8
		0<~<1	1	1							1	1	2	2
		1~<10					1				1		2	0
		10~<100	1	5	1	1	1	1				1	3	8
		100~<1000			1	2	2	2					3	4
		1000<~					1	2					1	2
		平均	1.1	16.9	184.1	192.0	416.1	555.3			0.7	4.6	127.7	171.9
最大	13.0	65.0	500.6	325.0	1806.3	1833.8			1.8	13.7	1806.3	1833.8		
HS湾中部	生食用 N=6	0	4	1									4	1
		0<~<1											0	0
		1~<10	2										2	0
		10~<100		2									0	2
		100~<1000		2									0	2
		1000~		1									0	1
		平均	2.0	382.3									2.0	382.3
最大	7.4	1399.9									7.4	1399.9		
HS湾南部	生食用 N=12	0							1	1		1	1	2
		0<~<1									2		2	0
		1~<10							2		1	1	3	1
		10~<100							4	4		1	4	5
		100~<1000							2	4			2	4
		1000~											0	0
		平均							82.5	149.9	1.3	8.4	62.2	114.5
最大							293.8	423.8	3.3	15.4	293.8	423.8		
HS湾西部	加熱用 N=15	0	1		3		1	1					5	1
		0<~<1	2										2	0
		1~<10	3					1					3	1
		10~<100		4	1	3	2	1					3	8
		100~<1000		2		1							0	3
		1000~			2	2							2	2
		平均	2.9	89.1	648.2	751.0	43.0	36.0					269.0	343.2
最大	9.0	221.5	2612.5	2606.3	67.0	98.1					2612.5	2606.3		
HS県海域	加熱用 N=36	0	3	3	3	2	3				3	3	12	8
		0<~<1					1	2			3		4	2
		1~<10				1			3		3	2	6	3
		10~<100			3	2	1	2	4	5		3	8	12
		100~<1000			3	2	1	2	2	4		1	6	9
		1000~				2							0	2
		平均	0.0	0.0	78.2	420.3	56.4	97.6	44.9	105.9	1.4	20.5	40.5	152.9
最大	0.0	0.0	305.2	1174.4	271.0	296.3	120.1	304.8	7.5	131.7	305.2	1174.4		

平成 14 年度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）  
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 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

主任研究者	国立感染症研究所	西尾 治
研究協力者	北海道立衛生研究所	吉澄 志摩
	広島市衛生研究所	野田 衛
	広島県保健環境センター	福田 伸治
	山口県環境保健研究センター	西田 知子
	長野県衛生公害研究所	徳竹 由美
	鳥取県衛生研究所	川本 歩
	国立感染症研究所	秋山 美穂

### 研究要旨

ウイルス性食中毒事例について、カキ関連のものは12月から4月に発生し、患者から検出されたノロウイルス（NV）は多様であり、このことは不特定多数のヒトから NV 汚染がカキの中腸腺で蓄積されていることによると考えられた。非貝類関連食中毒事例では、大規模な事例がしばしば見られ、患者、従事者から検出された NV の遺伝子型は同一であり、NV に汚染されたヒトのふん便あるいは吐物が食品に付着したことによると考えられた。食品を汚染させた要因のひとつとして従事者が示唆された。多くの患者ふん便 1g 中には1億個以上の NV 汚染があり、従事者は料理を作る前には徹底的な手洗いと、プラスチック手袋をして、直接食品に触れないことが食中毒防止に重要である。

乳幼児下痢症から検出された遺伝子型と食中毒事例から同一のものも見られ、関連性が示唆された。

### A. 研究目的

ウイルス性食中毒様集団発生について、その原因食材、発生状況等の疫学的、ウイルス学的解析を行い、今後の発生防止の対策に寄与することを目的としている。

### B. 研究方法

ウイルス性食中毒様集団発生事例のうち、カキ関連食中毒事例 13 事例、非カキ集団発生 23 事例について調査を行った。患者ふん便 301 件、従事者ふん便 165 件、吐物 24 件、食品 97 件はウイルス学的検査に用いた。

平成 14 年 11 月から平成 15 年 1 月の間に、急性胃腸炎を起こした患者 36 名のふん便を用いた。

検査材料から NV 検査にあたり本研究班では検査を統一して行った。その方法の詳細は報告書に掲載してあるので参照されたい。

すなわち、各カキから中腸腺を切出し、リン酸緩衝液で 10% 乳剤にし、粗遠心後の上清を超遠心分離して、ウイルスを濃縮した。

カキ濃縮材料、10%ふん便および吐物からのウイルス RNA の抽出は QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用い、抽出 RNA からの cDNA 合成は Superscript II (Invitrogen) を用いた。RT-PCR 法の NV 検出プライマーは、genogroup1 (G1) では 1st PCR COG1F/G1SKR→Nested PCR G1SKF/G1SKR、genogroup2 (G2) では 1st PCR COG2F/G2SKR→Nested PCR G2SKF/G2SKR および 1st PCR ALPF/G2ALSKR→Nested PCR G2SKF/G2ALSKR を用いた。リアルタイム PCR は、G1 ではプライマー：COG1F/COG1R、プローブ：RING1-TP(A)、RING1-TP(B)、G2 ではプライ