

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、ふん便および吐物は1g当たりのコピー数で示した。

RT-PCR法で陽性となったPCR産物はダイターミネーター法で遺伝子配列を決定し、UPGMA法で解析を行った。

C. 研究成績

1) カキ関連食中毒事例(表1)

カキ関連食中毒集団は2002年4月に2事例、6月に1事例、12月に5事例、2003年2月に4事例および3月に1事例発生した。

13事例の喫食者数は285名でそのうちの156名(55%)が発症した。ウイルス検査は患者からのふん便99件について行い、63名(64%)からNVが検出され、NVのgenogroup1(G1)が30件、G2が58件のふん便から検出された。遺伝子型は8事例について調べ、別紙に示したCでの遺伝子型に分けたところ、H-1で遺伝子型が一つであったが、その他の事例では複数認められた。N-10では4つの、H-14では5つの遺伝子型が認められた。患者からはG1のC-2、C-3(類似標準株:Winchester)、C-4(Southampton)、C-6(Chiba)、C-8、C-30(NV)、G2のC-9(Lordsdale)、C-10(MX)、C-11、C-15(SMV)、C-16(Hillingdon)、C-18(Amsterdam)で両遺伝子型ともに6つが見出された。吐物1件からはG2が検出され、遺伝子型はC-10(MX)であった。

従事者では40名についてウイルス検査を行い、3名からNVが検出され、G1が2名、G2が1名であったが、遺伝子解析は行えなかった。

食品のカキは事例H-1、N-27、N-26、Y-3、およびH-14からNVが検出され、遺伝子型は、事例N-27ではG2のC-9(Lordsdale)とC-10(MX)、N-26ではG1のC-6(Chiba)とG2のC-20(Miami)およびY-11ではC-6(Chiba)であった。

カキに含まれていたウイルス量は事例N-27では3個について行い、1個はG1、G2共に0コピーであったが、他の二個はG2が1万個に汚染されていた。事例N-26では2

個について検査を行い、G2が100コピーと10000コピーであった。Y-3は3個について行い、1個はG1、G2共に0コピー、他のひとつはG1が0コピー、G2が850コピー、残りのひとつはG1が200コピー、G2が12000コピーであった。

2) 非貝類関連食中毒事例(表2)

貝類に関連しない集団発生23事例では原因食品はH-11がきな粉パンでその他は不明である。このような非貝類では1事例当たりの規模が大きいものが多く、23事例のうち3事例は患者数が100名以上であった。

発症者は喫食者数が不明である5事例を除き2942名中1217名(41%)で、ウイルス検査は患者では202名中119名(59%)、従事者では125名中22名(18%)からノロウイルスが検出された。

患者からの遺伝子型は17事例について調べ、G1のC-6(Chiba)が2事例、G2ではC-9(Lordsdale)が5事例、C-10(MX)およびC-15(SMV)が各3事例、C-13(Chitta)、C-14(Hawaii)、C-16(Hillingdon)、C-31(Chitta, Hawaii)の4つの遺伝子型は各1事例であった。

従事者からの遺伝子型は10事例について調べ、G1ではC-6(Chiba)が1事例、G2ではC-9(Lordsdale)が3事例、C-10(MX)が2事例、C-14(Hawaii)、C-16(Hillingdon)、C-31(Chitta, Hawaii)の3つの遺伝子型は各1事例であった。

吐物では23件中9件(39%)からノロウイルスが検出された。遺伝子型は事例H-11がC-16(Hillingdon)であった。

食品で4件からNVが検出されているが、H-11のきな粉パン以外でNVが検出されたものは原因食材が不明であった。それらは給食、弁当等の混在物がNV陽性であった。

食品からの遺伝子型はH-11のきな粉パンがC-16(Hillingdon)であった。C-11はポリメラーゼ領域のプライマーで陽性が確認できた。

17事例における患者から検出された遺伝子型は事例毎で同一であり、且つ従事者からの遺伝子型も事例ごとのものと同一であった。

3) 患者ふん便中の NV 量

食中毒様集団発生事例からの 53 件 (患者 42 名、従事者 11 名) について NV を定量したところ、患者と従事者との間では従事者が若干排泄されているウイルス量が少ない傾向が見られた。ふん便 1g 中に 1 億個以上

のウイルスを排泄していたのは患者 41 名中 32 名 (78%)、従事者では 11 名中 5 名 (45%) であった。患者および従事者では NV の遺伝子型による違いはほとんど見られなかった。

表3 ふん便検体における NV 遺伝子型別によるコピー数

遺伝子型		検査数	コピー数/g (log10)						
			0 ≤ < 4.43	4.43 ≤ < 5	5 ≤ < 6	6 ≤ < 7	7 ≤ < 8	8 ≤ < 9	9 ≤
C-2	患者	1	0	0	0	0	0	0	1
C-3	患者	1	0	0	0	0	0	1	0
C-5	従事者	1	0	0	0	0	1	0	0
	患者	2	0	0	0	0	0	0	2
C-6	患者	4	0	0	0	0	0	0	4
C-9	従事者	4	0	0	1	2	0	1	0
	患者	15	1	0	0	0	2	4	8
C-10	患者	1	0	0	0	0	0	1	0
C-15	従事者	3	0	0	0	0	1	0	2
	患者	6	0	0	0	0	2	3	1
C-17	従事者	1	0	0	0	0	0	0	1
	患者	3	1	0	0	0	0	1	1
C-31	従事者	2	0	0	0	0	1	0	1
	患者	4	0	0	0	0	2	1	1
Lordsdale	患者	1	0	0	0	0	0	1	0
Sindlesham	患者	1	0	0	1	0	0	0	0
C-3, C-10	患者	1	0	0	0	0	0	0	1
C-6, C-11	患者	1	0	0	0	0	0	0	1
C-18, C-30	患者	1	0	1	0	0	0	0	0
計		53	2	1	2	2	9	13	24

4) 乳幼児下痢症患者からの NV 検出とその遺伝子型

乳幼児下痢症患者 36 名中 26 名から NV が検出された。そのうちの 21 件について遺伝子型を調べたところ G1 では C-4

(Southampton) が 1 件、G2 では C-9 (Lordsdale) が 15 件と最も多く、C-10 (MX) が 2 件、C-15 (SMV) が 1 件、C-20 (Miami) が 2 件であった。

D. 研究考察

カキ関連食中毒事例ではそれぞれの事例ごとに患者から検出される遺伝子型は複数の事が多い。このことはカキでは不特定多数のヒトからの NV が浄化槽、河川そして海水を汚染し、それがカキの中腸腺で蓄積されると考えられ、複数の NV 遺伝子型に汚染されたカキを食することにより、ヒトの体内で最も増殖されやすい遺伝子型が複製され、ヒトにより検出される遺伝子型が異なっていると推測される。したがって、患者から検出された遺伝子型とカキから検出されたものとは多くの事例で一致していない。カキでは最も多く存在している遺伝子型が検出され、それが患者で増殖する遺伝子型とは必ずしも一致しないことと考えられている。

原因カキのウイルス量は 3 事例で、3 個のうち少なくとも 1 個は NV が 850 コピー以上に汚染されており、NV は 100 個以下でヒトに感染・発病させることが知られ、カキ 1 個で発病させる量に汚染されていた。この点からもカキが原因食材と考えられた。

患者発生規模では非貝類関連食中毒事例ではしばしば患者数が 100 人以上の大規模なものが見られていることである。

非貝類関連食中毒事例では事例毎の患者から検出された遺伝子型は全て同一であり、かつ従事者からのものとも同一であった。このことは NV 汚染源が特定のヒトからのものと推測される。ここで注目すべきことは従事者からの遺伝子型も同一であり、食品汚染が従事者によって起こされていると推測されるが、従事者も患者と同一の食事を喫食しておれば、流通過程による汚染も考えられる。いずれにしてもヒトを介しての食中毒事例と考えられヒトが注意すれば防止可能である。

今回 NV 感染患者のふん便中の NV 量を定量したところ、多くのふん便中にはウイルスが 1g 中に 1 億個以上存在しており、NV に汚染されたふん便のほんの僅かが付着しても多くのヒトを感染・発病させる NV 量であるといえる。従って、給食・料理従事者は料理を作る前には徹底的に手を洗い、感染防止に努めることが必要である。

乳幼児から見出された遺伝子型の多くは非カキ事例および食中毒事例からも検出されており、ノロウイルスによる乳幼児下痢

症と食中毒様集団発生との関連性が示唆された。

E. まとめ

食中毒事例について、カキ関連のもの、非貝類関連のものについて分けて検討した。カキ関連では患者から検出される遺伝子型は多様であった。非貝類関連事例はヒトからの食品汚染が推測され、時として大規模な事例となっていた。

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

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、蕨城昇次、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、蕨城昇次、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

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

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

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

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

新川奈緒美、伊東祐治、西尾 治 他；ノーウォークウイルスによる食中毒事例と排泄されるウイルス量について、第 44 回鹿児島県公衆衛生学会、2002、鹿児島市

新川奈緒美、中山浩一郎、湯又義勝、西尾治；Norwalk virus による集団発生事例の疫学と患者から排泄されるウイルス量、第 28 回九州衛生環境技術協議会、2002、宮崎市

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 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

研究協力者	広島県保健環境センター	福田 伸治
	宮城県保健環境センター	渡辺 節、植木 洋
	北海道立衛生研究所	吉澄 志摩
	佐賀県衛生薬業センター	安藤 克幸
	埼玉県衛生研究所	篠原 美千代
	愛媛県立衛生環境研究所	大瀬戸 光明
	国立感染症研究所	山口 卓、秋山 美穂
主任研究者	国立感染症研究所	西尾 治

研究要旨

カキの生食用養殖海域における海水の NV 汚染状況は 5 海域の 25 地点で冬季を中心に原則として毎月海水とカキを 1 回採取して定点観測を行った。海水でリアルタイム PCR における実測値が 10 コピー以上を示し、NV 汚染が認められたのは、A 海域および O 海域地点の各 1 地点で 1 月、3 月であった。O 海域のその地点には、河川を通して下水処理場の放流水の流入があり、これが汚染源と推測された。カキも 1 月、2 月に NV 陽性率が高くなっていた。

カキ養殖筏のカキでは上部がもっとも NV 検出率が高く、次いで中部であり、下部からは NV が検出されなかった。河川水と共に流入した NV は筏の中央（海面下 4.5m）付近までのカキを汚染していることが示唆された。

H 海域では海水温と塩分濃度による NV 汚染との関連性は認められなかった。

カキ 1 個を 1 検体とする今回の NV 検査では、同一ロットのカキでも陽性と陰性の結果が見られることから、養殖海域カキの安全性の確認や食中毒事例の検査における検体数を検討し、全国的に統一する必要があると思われた。

A. 研究目的

カキ等によるノロウイルス（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。平成 13 年度に厚生労働省に届けられた NV による事例数は 269 事例、患者数は 7,371 名で病原物質別で第一位である。NV による事例数のうち、カキが媒介と推定されているものは約半数を占めている。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。

本研究ではカキの NV 汚染と養殖海域及び流入河川水との関連を調査し、これら環境水とカキ汚染の実態を把握する（定期検査）。

カキの NV 汚染には同一ロットでもばらつきがあることから、同一養殖ロープのカキを対象に調査しカキへの汚染経路を明らかにする（水平垂直分布調査）。

さらに、海水温、塩分濃度をも調べた。

B. 研究材料と方法

H 海域では生食用カキ出荷海域 5 地点で平成 14 年 11 月から平成 15 年 2 月の間に毎月 1 回、海水 20L とその場所で養殖されているカキ 2 個を採取した。

筏部位別 NV 検出状況調査には加熱調理用海域の筏の四隅と真中の 5 箇所の上 (海面下 0.5m)、中 (4.5m)、下 (9m) のカキについて実施した。

M 定期調査は平成 14 年 5 月から平成 15 年 2 月までの毎月 1 回計 10 回、水平垂直分布調査は平成 15 年 2 月に行った。

M 海域内に定めた定点観察 2 地点の養殖カキ 47 件、海水 15 件 (各 10L) 及び流入河川水 (各 5L) 14 件を対象とした。なお外湾は A 河川、内湾は B 河川の影響を受けると考えられる。

水平垂直分布調査は外湾海域の養殖ロープを北から南に向かって a, b, c とし、それぞれ表層 (0.5m)、中層 (7m)、下層 (15m) の養殖カキ 3 件ずつ計 27 件を対象とした。

O 海域のカキ養殖海域において 4 つのポイント (A, B, C, D) を定め、4 ポイント 11 定点 (A-1, 2, 3, B-1, C-1, 2, 3, D-1, 2, 3, 4) からカキを採取し、3 ポイント 3 定点 (A-2, C-2, D-2) から海水を 20L 採取した。カキは 2002 年 10 月から 2002 年 3 月まで、毎月 1 回採取した。

ただし、O 海域は 12 月下旬に結氷することから、定点 B-1, C-1, 2, 3 のカキは 12 月で採捕を終了し、検体採取は 12 月までとなった。また、定点 D-1, 2, 3 のカキは 12 月下旬に D-4 地点に移動されるため、D-1, 2, 3 の採取は 12 月までとなり、それ以降は D-4 を定点とした。なお、カキは中腸腺 1g を RNA 抽出に用いた。海水は 2002 年 11 月から 2003 年 3 月まで、毎月 1 回、表層から 20L を採取した。海水採取時に、海水温の測定も行った。

A 海域は 2 地点で 2003 年 1 月から 3 月の間に月 1 回 A-1 地域では海水を 5 地点から 1 回につき 12L とカキ 5 個を 1 件として、A-2 は海水 12L とカキは 7 個を 1 件として、NV 汚染を調べた。

海水および河川水は片山らによる陰電荷膜を用いた酸洗浄・アルカリ誘出方法で濃縮した。回収液を 40,000rpm、2h 遠心し、その沈査を DDW 140 μ L で浮遊させ RNA 抽出材料とした。

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。濃縮材料からのウイルス RNA の抽出は海水と同様に行った。

海水および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 \rightarrow Nested PCR G1SKF/G1SKR、genogroup2 (G2) では 1st PCR COG2F/G2SKR \rightarrow Nested PCR G2SKF/G2SKR および 1st PCR ALPF/G2ALSKR \rightarrow 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。HAV 検出のリアルタイム PCR では、プライマー：HAV+449/HAV-557、プローブ：HA+482-P-TET 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、M 海域および A 海域がカキ中腸腺 1 個当たりのコピー数で示し、H 海域、O 海域がカキ中腸腺 1g 当たりのコピー数で示した。

C. 研究成績

1. H 海域

1) カキ養殖海域における Norwalk virus の検出

(1) 定量的分布 (表 1)

海水においては、リアルタイム PCR で 11 月および 12 月に各 1 地点から検出された。遺伝子量は 0.18 コピーおよび 2.4 コピー/1 μ l であったが、実測値 (4 μ l 中のコピー数) はすべて 10 コピー以下と小さく、RT-semi nested PCR では検出されなかった。

汽水においては、リアルタイム PCR および RT-semi nested PCR とも検出されなかった。

カキにおいては、リアルタイム PCR で 11 月に 1 地点、12 月に 3 地点、2 月に 2 地点から検出され、12 月および 2 月の検出率が高かった。遺伝子量は G1 で 0.88 コピーから 4.14 コピー/g、G2

で 4.69 コピーから 65.75 コピー/g の範囲であったが、実測値 (4 μ l) は 10 コピー以下と小さく、RT-semi nested PCR では 11 月および 2 月に各 1 地点から検出されたのみであった。

(2) 検出株の系統解析 (図 1)

カキから検出された 2 株は、G1 の C-5 (NV) 類似株と G2 の C-13 (Chitta) 類似株であった。G1 は 2 月に採取したカキから、G2 は 11 月に採取したカキから検出された。

2) 筏部位別 Norwalk virus 検出状況
(表 2)

加熱調理用海域の筏の四隅と真中の 5 箇所の上 (海面下 0.5m)、中 (4.5m)、下 (9m) のカキについて実施したところ、部位によらず上および中での検出率が高かった。リアルタイム PCR で検出された遺伝子量は遺伝子型 I で 0.5 コピーから 3.4 コピー/g、遺伝子型 II で 6.5 コピーから 61.6 コピー/g であったが、実測値 (4 μ l) はすべて 10 コピー以下であった。なお、海水の塩分濃度、海水温と NV の汚染との関連性は認められなかった。

表1 海水・カキにおけるNV量

検査定点 (検体No.)	採取年月日	塩分布度(%)	水温(℃)	海水NV量(/l)				カキNV量(/g)			
				Real time		RT-PCR		Real time		RT-PCR	
				G1	G2	G1	G2	G1	G2	G1	G2
1-1	02/11/19	2.93	17.2	-	-	-	-	-	-	-	-
1-2				-	-	-	-	-	-	-	-
2-1	02/11/19	2.93	17.1	-	-	-	-	-	-	-	-
2-2				-	-	-	-	-	-	-	-
3-1	02/11/19	2.94	17.3	-	-	-	-	-	-	-	-
3-2				-	-	-	-	-	-	-	-
4-1	02/11/19	2.94	17.1	-	0.18	-	-	-	-	-	-
4-2				-	-	-	-	-	-	-	-
5-1	02/11/19	2.94	16.2	-	-	-	-	-	-	-	+
5-2				-	-	-	-	4.14	-	-	-
6	02/11/16		18.0	-	-	-	-	-	-	-	-

1-1	02/12/09	2.98	14.6	-	-	-	-	-	7.13	-	-
1-2				-	-	-	-	-	6.88	-	-
2-1	02/12/09	2.97	14.9	-	-	-	-	-	-	-	-
2-2				-	-	-	-	-	-	-	-
3-1	02/12/09	2.98	13.9	-	2.4	-	-	-	-	-	-
3-2				-	-	-	-	-	4.69	-	-
4-1	02/12/09	2.97	14.7	-	-	-	-	-	-	-	-
4-2				-	-	-	-	-	-	-	-
5-1	02/12/09	2.96	13.8	-	-	-	-	-	-	-	-
5-2				-	-	-	-	-	6.18	-	-
6	02/12/07		15.8	-	-	-	-	-	-	-	-

1-1	03/01/20	2.71	10.3	-	-	-	-	-	-	-	-
1-2				-	-	-	-	-	-	-	-
2-1	03/01/20	2.85	10.8	-	-	-	-	-	-	-	-
2-2				-	-	-	-	-	-	-	-
3-1	03/01/20	2.82	11.1	-	-	-	-	-	-	-	-
3-2				-	-	-	-	-	-	-	-
4-1	03/01/20	2.83	10.9	-	-	-	-	-	-	-	-
4-2				-	-	-	-	-	-	-	-
5-1	03/01/20	2.84	10.3	-	-	-	-	-	-	-	-
5-2				-	-	-	-	-	-	-	-
6	03/01/18		12.1	-	-	-	-	-	-	-	-

1-1	03/02/04	2.93	9.1	-	-	-	-	-	-	-	-
1-2				-	-	-	-	3.38	65.75	-	-
2-1	03/02/04	2.95	8.5	-	-	-	-	-	-	-	-
2-2				-	-	-	-	-	-	-	-
3-1	03/02/04	2.91	9.2	-	-	-	-	-	23.13	-	-
3-2				-	-	-	-	0.88	10.13	+	-
4-1	03/02/04	2.95	9.1	-	-	-	-	-	-	-	-
4-2				-	-	-	-	-	-	-	-
5-1	03/02/04	2.96	9.0	-	-	-	-	-	-	-	-
5-2				-	-	-	-	-	-	-	-
6	03/02/02		10.3	-	-	-	-	-	-	-	-

G1: 遺伝子型I, G2: 遺伝子型II, RT-PCR: RT-seminested PCR

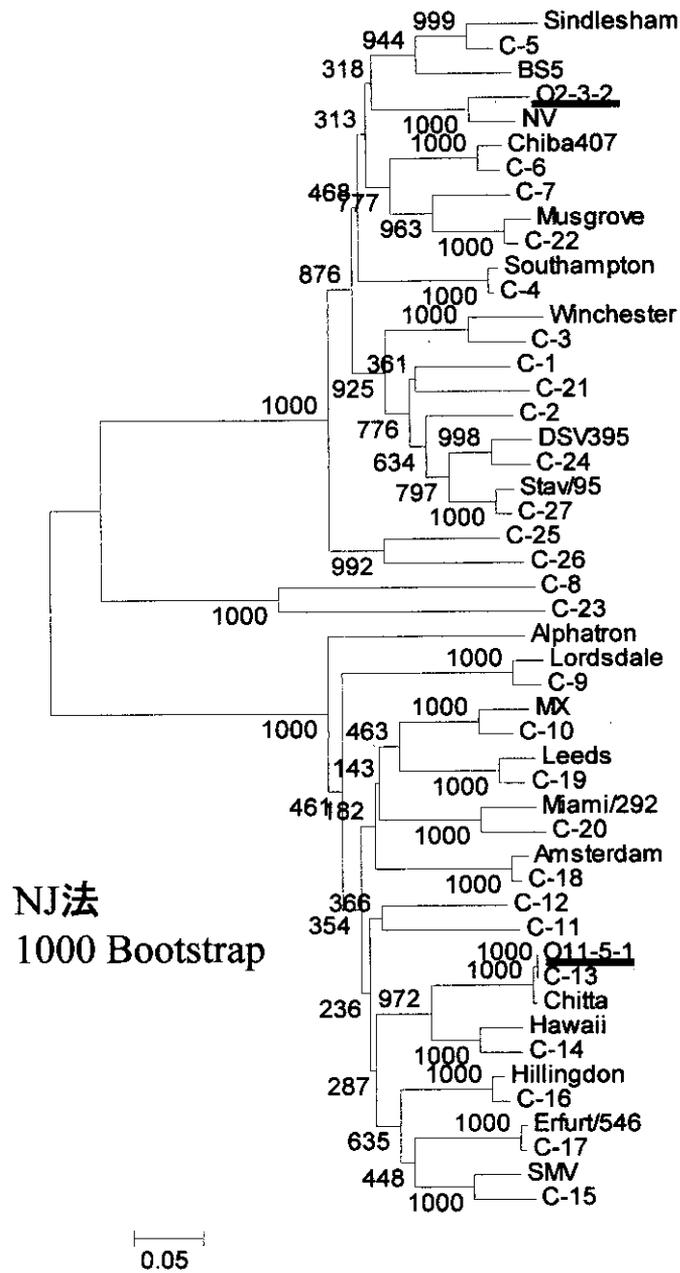


図1 カキから検出したNorwalk virusの系統樹

2. M海域

1) M海域の海水、河川水およびカキのNV汚染の定点観測

M海域の定期調査では8月に内湾流入河川水および10月の外湾から採取した養殖カキ3件中2件からRT-PCR法でNVが検出され、シーケンスで確認を行った。NVが検出された3件はいずれもG2SKF/R

プライマーで検出された。一方リアルタイムPCRでは養殖カキの検査で10コピー以上(カキ1個当たり120コピー以上)を示すものは認められなかった。なお、海水からは両検査法でNVが検出されなかった。

RT-PCRで陽性となった3検体の系統解析の結果は95.5%以上の相同性を示した。

表3 M地域の海水、河川水、カキNV検出状況

検査 定点	採取 年月	海水				河川水				カキ						
		No.	Real time (copies/L)		RT-PCR		No.	Real time (copies/L)		RT-PCR		No.	Real time (copies/個)		RT-PCR	
			G1	G2	G1	G2		G1	G2	G1	G2		G1	G2	G1	G2
外湾	02/05	1			-	-					1	-	0.71	-	-	
		2									2	-	-	-	-	
		3									3	-	-	-	-	
内湾	02/05	4			-	-					4	-	-	-	-	
		5									5	-	-	-	-	
		6									6	-	-	-	-	
外湾	02/06	3			-	-	1			-	-	7	-	-	-	-
			8									8	-	-	-	-
内湾	02/06	4			-	-	2			-	-	9			-	-
			10									10	-	-	-	-
			11									11	-	-	-	-
外湾	02/07	5	-	-	-	-	3	-	-	-	-	12	-	5.91	-	-
			13									13	-	-	-	-
			14									14	-	-	-	-
内湾	02/07	6	-	-	-	-	4	-	-	-	-	15	-	-	-	-
			16									16	-	-	-	-
			17									17	-	-	-	-
外湾	02/08						5	-	-	-	-	18	-	-	-	-
			19									19	-	-	-	-
			20									20	-	-	-	-
内湾	02/08	8	-	-	-	-	6	-	-	-	+	21	-	-	-	-
			22									22	-	-	-	-
			23									23	-	-	-	-
外湾	02/09	9	-	-	-	-	7	-	-	-	-	24	-	-	-	-
			25									25	-	-	-	-
			26									26	-	-	-	-
内湾	02/09	10	-	-	-	-	8	-	-	-	-	27	-	-	-	-
			28									28	-	-	-	-
			29									29	-	-	-	-
外湾	02/10	11	-	-	-	-	9	-	-	-	-	30	-	-	-	+
			31									31	-	-	-	+
			32									32	-	-	-	-
内湾	02/10	12	-	-	-	-	10	-	-	-	-	33	-	-	-	-
			34									34	-	-	-	-
			35									35	-	-	-	-

外湾	02/11	13	-	-	-	-	11	-	-	-	-	36	-	-	-	-
			37	0.09	-	-	-									
			38	-	-	-	-									
内湾	02/11	14	-	-	-	-	12	-	-	-	-	39	-	0.08	-	-
			40	-	-	-	-									
			41	-	-	-	-									
外湾	02/12	15	-	-	-	-	13	-	-	-	-	42	-	-	-	-
			43	-	-	-	-									
			44	-	-	-	-									
内湾	02/12	16	-	-	-	-	14	-	-	-	-	45	-	-	-	-
			46	-	-	-	-									
			47	-	-	-	-									

2) 筏部位別 NV 量 各 3 個のカキ 27 件実施したが、定性 PCR、
 水平垂直分布調査では表層 (0.5m)、中層 リアルタイム PCR とも NV は検出されなかつ
 (7m) および下層 (15m) について 5 地点で た

表 4 SRSV 水平垂直分布調査結果

No	採取地点	層	水温 (°C)	カキ番号	RT-PCR	Real time PCR
1	a	表層 (0.5m)	6.8	1	-	0
2				-	0	
3				-	0	
4		中層 (7m)	6.9	1	-	0
5				-	0	
6				-	0	
7		下層 (15m)	7.5	1	-	0
8				-	0	
9				-	0	
10	b	表層 (0.5m)	6.6	1	-	0
11				-	0	
12				-	0	
13		中層 (7m)	6.9	1	-	0
14				-	0	
15				-	0	
16		下層 (15m)	7.4	1	-	0
17				-	0	
18				-	0	
19	c	表層 (0.5m)	6.6	1	-	0
20				-	0	
21				-	0	
22		中層 (7m)	6.9	1	-	0
23				-	0	
24				-	0	
25		下層 (15m)	7.4	1	-	0
26				-	0	
27				-	0	

- : RT-PCR 陰性

3. 0 海域

カキ及び海水からのNV検出状況を表5に示した。RT-PCRで検出されたものについては検出された株の遺伝子型を示し、検出されなかったものについては「-」とした。リアルタイムPCRの結果については、カキは中腸腺1g当たり、海水は1リットル当たりのコピー数を示し、0コピーの場合は「-」とした。カキ・海水ともに、12月まではすべての定点でNVは検出されなかつ

た。1月になって、RT-PCRで定点C-2の海水から、リアルタイムPCRで定点C-2およびD-2の海水。3月においても、RT-PCRで定点C-2の海水からNVが検出された。1月および2月に定点C-2の海水から検出されたG1株の塩基配列は、100%一致した。

海水採取定点の水温は表6に示したように11月の時点ですでに10℃を下回っていた。

表5 海水及びカキからのNV検出状況

定点	検体	02年10月		02年11月		02年12月		03年01月		03年02月		03年03月	
		RT-PCR	Real time PCR	RT-PCR	Real time PCR	RT-PCR	Real time PCR	RT-PCR	Real time PCR	RT-PCR	Real time PCR	RT-PCR	Real time PCR
A-1	カキ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A-2	カキ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G2	-
	海水	NT	NT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G2 (0.045)
A-3	カキ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G2 (8.3)	NT	NT
B-1	カキ	-	-	-	-	-	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT
C-1	カキ	-	-	-	-	-	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	カキ	-	-	-	-	-	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT
C-2	海水	NT	NT	-	-	-	-	G1 (C-6) G2 (C-20)	G1 (3.7) G2 (8.2)	G1 (C-6)	G1 (5.5) G2 (5.7)	G1 G2	G1 (8.0) G2 (5.1)
	カキ	-	-	-	-	-	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT
C-3	カキ	-	-	-	-	-	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT
D-1	カキ	-	-	-	-	-	-	NT	NT	NT	NT	-	G2 (8.2)
D-2	カキ	-	-	-	-	-	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	海水	NT	NT	-	-	-	-	-	G2 (2.7)	-	-	-	-
D-3	カキ	-	-	-	-	-	-	NT	NT	-	G1 (24.2) G2 (12.8)	-	G2 (14)
D-4	カキ	NT	NT	NT	NT	NT	NT	-	G1 (6.7)	-	-	-	-

※ NT: not tested

※ リアルタイムPCRによる結果については、海水は1リットル、カキは中腸腺1g当たりのコピー数で示した。

表6 定点における海水温 (水深1m)

定点	02年11月	02年12月	03年01月
A-2	6.79	0.83	-1.75
C-2	6.68	-0.87	-0.86
D-2	6.04	-1.60	-1.13

4. A 海域

A 海域は 2 地点で 2003 年 1 月から 3 月の間に月 1 回 A-1 地域では海水を 5 地点から 1 回につき 12L とカキ 5 個を 1 件として、A-2 は海水 12L とカキは 7 個を 1 件として、NV 汚染を調べた。

A 海域のリアルタイム PCR で、海水では 1 月の A-1-2 で G2 が海水 1L 中に 12 コピー

認められ、A-2-6 で海水 1L 中に 8 コピー存在していた。そのほかはいずれも検査で擬陽性か、陰性であった。RT-PCR では、2 月の A-2-6 は G1 と G2 が、A-2-7 は G1 が、3 月は A-1-2 と 5 で G2 が陽性であった。

カキではリアルタイム PCR で 1 個当たり、はっきりと陽性を示したのは 3 月の A-1-1 の G2 のみであった。

表 7 A 海域の海水およびカキの NV 汚染状況

検査 定点	採取 年月	海水					カキ				
		No.	Real time (copies/L)		RT-PCR		No.	Real time (copies/個)		RT-PCR	
			G1	G2	G1	G2		G1	G2	G1	G2
A-1	03/01	1	0	3	-	-	1	0	0	-	-
		2	0	12	-	-	2	0	0	-	+
		3	4	3	-	-	3	0	13	-	-
		4	0	0	-	-	4	0	0	-	-
		5	0	0.03	-	-	5	0	0	-	-
A-2	03/01	6	0	8	+	+	6	0	0	-	-
		7	0	0	+	-	7	0	0	-	+
A-1	03/02	1	0	0	-	-	1	0.6	0.5	-	-
		2	0.05	1	-	-	2	0	0.8	-	+
		3	0.3	0.2	-	-	3	0	0	-	-
		4	0.1	0	-	-	4	0	0.5	-	-
		5	0	0	-	-	5	0	0	-	-
A-2	03/02	6	3.5	2	+	+	6	0	1	-	-
		7	0	0	+	-	7	0	0.05	-	+
A-1	03/03	1	0	0	-	-	1	0	32	-	-
		2	5	2	-	+	2	0	0.5	-	-
		3	0	0	-	-	3	0	2	-	-
		4	0	0.4	-	-	4	0	0.3	-	-
		5	0	0	-	+	5	0	6	-	+
A-2	03/03	6	3	0.2	-	-	6	0	0	-	-
		7	0	0	-	-	7	4	1.2	-	-

表8 A海域のカキにおける紫外線照射殺菌の効果

採取年月	紫外線照射前				紫外線照射後			
	Real time (copies/個)		RT-PCR		Real time (copies/個)		RT-PCR	
	G1	G2	G1	G2	G1	G2	G1	G2
02/12	0	0	-	-	0	0	-	-
	0	0	-	-	0	0	-	-
03/03	0	0	-	-	0	0	-	-
	0	0	-	-	0	0	-	-

D. 研究考察

カキの生食用養殖海域における海水の NV 汚染状況は 5 海域の 25 地点で冬季を中心に原則として毎月 1 回採取して定点観測を行った。海水でリアルタイム PCR における実測値が 10 コピー以上を示したのは、もっとも人口が少なくウイルス汚染の危険性が少ないと予測された O 海域地点で 1 月と 3 月、A 海域の 1 月に 1 地点で NV が認められたに過ぎなかった。O 海域の定点とした A ~D 地点のうち、A および D 地点へは下水処理場からの排水が直接流入しており、C 地点へは、河川を通して下水処理場の放流水の流入がある。ただし、A および D 地点への流入に関わる下水処理場は、どちらも漁村の約 100 世帯をまかなっているにすぎず、一方 C 地点への流入に関わる下水処理場は、約 730 世帯の処理を行っている。このことから、この海域において、ヒト糞便による汚染の危険性は C 地点でもっとも高いことが予想され、今回の海水調査において、定点 A, C, D のうち RT-PCR で NV が検出されたのは C 地点の海水のみであった。本海域への流入下水に関与する世帯数は 1000 世帯以下であり、他県のカキ養殖海域と比べて非常に少ない。したがって海水の NV 汚染が検出限界以上になるためには、母数が少ない O 地域では、他県より、ヒトにおける NV 感染率が高くならなければならないと考えられる。今回、海水及びカキからの NV 検出開始が他県より遅く、1 月から認められたことや、ウイルス量が少ないことは、このことが大きく関与していると考えられる。12 月にカキ養殖海域と同じ管内において発生した食中毒事例由来の NV 遺伝子と、定点

C-2 の海水から 1 月及び 2 月に検出された NV 遺伝子の塩基配列が 100%一致しており、ヒトでの NV 感染状況と海水の汚染の間に関連が認められた。

その他の海域では実測地 10 コピー以上を示さなかったが、1, 2 月にリアルタイム PCR で NV が 10 コピー以下のものが認められ、この時期に海水が NV に汚染されると考えられた。

昨年度の調査で同一筏から採取したカキで、NV 陽性と陰性のものが認められた。そこで筏の上部、中部、下部で NV 汚染が異なると推測されたので、本年度は 2 海域の 5 地点で筏の部位別による NV 検出状況を調べた。H 海域では上 (海面下 0.5m) および中 (4.5m) の検出率が高く、水深による差が示唆された。すなわち海水の表層が NV に最も汚染を受ける傾向が認められた。これは降雨等により河川水が増量し、NV に汚染された河川水がカキを養殖している海域の表層に流入し、表層のカキが河川水に最初に接することによると推測される。

なお、M 海域では冬期に検査した 3 地点で、上部 (0.5m)、中部 (7m)、下部 (15m) ともに NV 陰性で、筏の部位別の汚染状況について明らかにすることができなかった。M 海域の内湾と外湾との NV 汚染状況の違いを検討した。外湾は主に A 河川の影響を受けるのに対して、内湾は B 河川の影響を受けていると考えられる。RT-PCR およびリアルタイム PCR の実測値 10 コピー以下も比較のために一応陽性として行った結果を総括して解析すると、養殖カキの NV 検出状況は内湾で 4.2%、外湾は 21.7%と約 5 倍高率で外湾の NV 汚染頻度が高い成績が得られ

た。しかし、今回の調査では検出頻度が低率且つリアルタイムPCRで実測価10コピー以下であり、両海域の環境水の影響を明確にすることはできなかったが海域によるNV汚染の違いが示唆された。次に、リアルタイムPCR陽性で定性PCR陰性の検体が認められ、リアルタイムPCRの検出感度が高いことが明らかとなった。また、系統解析の結果、検出されたNVの相同性が95.5%以上であり、M海域ではこの型のウイルス汚染が広範囲に及んでいたと推察された。

H海域では海水温と塩分濃度によるNV汚染との関連性は認められなかった。しかしO海域の水温は11月には既に10℃を大きく下回っており、12月以降はマイナスになるが、この水温でのカキの活性（海水の吸い込み量や消化機能など）がどの程度なのかは不明であり、海水の汚染が直接カキの汚染につながるかどうか、今後の検討が必要である。また、海面が結氷した後は、海流や河川からの流入水の拡散が結氷前とは異なると考えられることと、海水からのNV検出が結氷以降から認められたことから、結氷がカキ養殖海域の海水汚染に関与している可能性も考えられた。

カキ1個を1検体とする今回のNV検査では、同一ロットのカキでも陽性と陰性の結果が見られたことから、養殖海域の養殖の表層から下層のどの地点を検査対象として安全性を確認し、また食中毒事例の検査における検体数を検討して、安全性の確保にこれらの問題を明らかにし、カキの検査法を全国的に統一する必要があると思われた。

E. まとめ

カキの養殖5海域の25地点で海水とそこで養殖されているカキのNV量を調べた。冬季の2海域でNV汚染が認められたが、カキでは実測価で10コピー以上のものは見られなかった。養殖筏の表層、中層、下層でのカキのNV汚染を調べたところ、表層が最も汚染されやすい傾向が見られた。

F. 研究発表

1. 論文発表

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

藤本嗣人、近平雅嗣、山本昭夫、増田邦義、西尾治：風疹ワクチンおよび抗体価検査に関する中学生の知識調査、兵庫県立健康環境科学研究センター平成13年年報、1、1-4、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、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（ノーウオークウイルス）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

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オ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

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. 4th 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. 36th 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. 1st 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

新川奈緒美、伊東祐治、西尾 治 他；ノーウォークウイルスによる食中毒事例と排泄されるウイルス量について、第 44 回鹿児島県公衆衛生学会、2002、鹿児島市

新川奈緒美、中山浩一郎、湯又義勝、西尾治；Norwalk virus による集団発生事例の疫学と患者から排泄されるウイルス量、第 28 回九州衛生環境技術協議会、2002、宮崎市

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 リアルタイムPCR法で得られた低い値の信頼性について

研究協力者 埼玉県衛生研究所 篠原美千代

主任研究者 国立感染症研究所 西尾 治

研究要旨

食品の検査においてリアルタイム PCR 法で実測値 10 コピー以上を示したものは RT-PCR 法の Nested PCR および 2nd リアルタイム PCR でも全て陽性を示したことから、陽性と判断して間違いないものと考えられた。実測値 10 コピー未満のときに、2nd リアルタイム PCR を行うことにより、検査精度が高まった。

A. 研究目的

リアルタイムPCRで検査実数で10コピー以下は信頼性にやや欠けるので、判定に困難をしばしばきたす。そこで、検査実数10コピー以下のときに、陽性あるいは陰性の診断を如何に行うかを検討した。

B. 研究方法

カキ137個を用い、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、G1では1st PCR COG1F/G1SKR→Nested PCR G1SKF/G1SKR、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。

2ndリアルタイムPCRは通常のRT-PCR法