

のプライマーCOG1F/G1SKR、COG2F/G2SKRを用いて、35 サイクルで増幅した後、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を用いて通常の方法で行った。

C. 研究結果

リアルタイム PCR と 2nd PCR の結果の比較を表 1 に示した。検査は COG F プライマーと SK R プライマーを用いて 1st PCR を 35 回行い、この 1st PCR 産物を用いて、リアルタイム PCR (2nd リアルタイムと略す) と通常の Nested PCR (プライマーは SK F/SK R) を実施した。通常のリアルタイム PCR の結果、コピー数が 0 であった検体についてみると、G1 では 2nd リアルタイムで 11%、Nested PCR で 9% が陽性であった。0~3 コピーであった検体では、それぞれ、22%、17%、3~10 コピーの検体では 30%、8% が陽性であった。10 コピー以上であった検体はすべて陽性であった。G2 ではコピー数 0 で 2nd リアルタイムで 15%、Nested PCR では 3%、0~3 コピーで、59%、43%、3~10 コピーではともに 80% が陽性で、10 コピー以上では G1 同様すべて陽性であった。

2nd リアルタイム陽性の検体は G1 で 15 検体、G2 で 55 検体、2nd PCR 陽性は G1 で

12 検体、G2 で 37 検体であり、今回検討に用いた検体では 2nd PCR で陽性であった検体はすべて 2nd リアルタイムで陽性であった。これ以外の検体で Nested PCR のみが陽性となった検体があったが、シーケンスをしたところ、NV の遺伝子ではないことが判明している。また逆に、2nd リアルタイムだけが陽性の検体の Nested PCR 産物を QIAGEN の精製キットで精製した後シーケンスをしたところ、NV の遺伝子が確認された検体もあった。

D. 研究考察

リアルタイム PCR で実測値が 10 コピー以上を示したものは通常の RT-PCR 法および 2nd リアルタイム PCR で全て陽性となったことから、10 コピー以上の値を示したものは陽性と判断して間違いないものと考えられた。

通常のリアルタイム PCR で 0 コピーであったものは 2nd リアルタイム PCR では G1 で 11%、G2 で 15% が陽性で、検査実測値 3~10 コピーを示したものは 2nd リアルタイム PCR では G1 で 30%、G2 で 80% が陽性であった。このことから、検査実測値 10 コピー未満のものは必ずしも陽性とは言えない。検査実測値が 10 コピー以上のものは今回われわれが示した 2nd リアルタイム PCR を行うことにより、正確な診断が行えると考えられた。

リアルタイム PCR で低い値のときに、通常の Nested PCR の代わりに、2nd リアルタイム PCR を行うと感度も上がりハイブリダイゼーションの必要もないので、優れた方法であると思われる。ただし、2nd リアル

タイムで感度は大幅に向上するが、コンタミネーションの危険が少ないというリアルタイム PCR の利点は生かせないし、2nd リアルタイム PCR での値は定量的でないという欠点がある。

表1 Realtime PCR と 2ndPCR の結果比較

G1

Realtime PCR		2nd			
		Realtime PCR		Common PCR	
copy 数	n	+	-	+	-
0	47	5 (11%)	42 (89%)	4 (9%)	43 (91%)
0~3	23	5 (22%)	18 (78%)	4 (17%)	19 (83%)
3~10	10	3 (30%)	7 (70%)	2 (20%)	8 (80%)
10<=	2	2 (100%)	0	2 (100%)	0

G2

Realtime PCR		2nd			
		Realtime PCR		Common PCR	
copy 数	n	+	-	+	-
0	62	9 (15%)	53 (85%)	2 (3%)	60 (97%)
0~3	69	41 (59%)	28 (41%)	30 (43%)	39 (57%)
3~10	5	4 (80%)	1 (20%)	4 (80%)	1 (20%)
10<=	1	1 (100%)	0	1 (100%)	0

1st PCR COGF/SKR

2nd PCR SKF/SKR

E. まとめ

リアルタイムPCRで検査実測値が10コピー以上の時には、ウイルス陽性と判断することができる。10 コピー未満の時には直ちに陽性と判定することはできない。10 コピー未満の低い値の時には 2nd リアルタイムPCR を行うことにより検査精度が高くなる。

F. 研究発表

なし

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に関する研究

分担研究項目：検査法の評価、食品のウイルス汚染状況調査・研究

分担研究者 春木孝祐 大阪市立環境科学研究所 微生物保健課長

協力研究者 勢戸祥介 大阪市立環境科学研究所 企画調整課 研究主任

入谷展弘 大阪市立環境科学研究所 微生物保健課 研究員

研究要旨

2002 年 4 月から 2003 年 2 月の期間に、22 事例から Norwalk virus (NV) を検出し、8 事例はカキの喫食に伴う事例であった。

市販カキ 32 ロットについて NV および A 型肝炎ウイルス (HAV) の検索を行い、5 ロットから NV を検出し、1 ロットから HAV を検出した。

NV 食中毒患者ふん便より検出された NV の遺伝子型は 11 クラスター以上に分類され、NV の流行像の多様性が示された。

A. 研究目的

冬期に多発するウイルス性食中毒の主要な原因物質として NV が知られており、原因食品としてカキが関与している場合が多い。大阪市内で発生した非細菌性食中毒事例の患者ふん便・従事者ふん便・原因食材について NV の検索を行い、検出された NV の遺伝学的系統解析を行い、NV の流行実態を解明を試みた。

市販カキの NV および HAV の汚染実態を明らかにする目的で、経時的汚染調査、生産地別の汚染状況について調査した。

B. 研究方法

1) 検査材料

2002 年 4 月から 2003 年 2 月に当研究

所に検査依頼のあったウイルス性食中毒の疑われた 34 事例の患者ふん便 84 検体、調理従事者ふん便 104 検体および食品 14 検体（カキ 5 検体を含む）を用いた。市販カキは、2002 年 10 月から 12 月に購入した生食用カキと加熱調理用カキ計 8 ロットおよび 12 月に生食用カキ 24 ロットを購入し、1 ロットにつきカキ 3 個をウイルスの検索に用いた。

2) cDNA の作製

ふん便は 10% 乳剤を作製し 140 μ l を QIAmp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて 60 μ l の RNase DNase free Water でウイルス RNA を溶出した。カキは中腸腺を摘出し 10 ml の PBS で乳剤とした後、食材は PBS で 10% 乳剤とした後、10,000 rpm 10 min 遠心上清

を 30% シュークローズに重層後、40,000 rpm 120 min 遠心し、沈渣を 140 μ l の蒸留水に再浮遊後、QIAmp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて 30 μ l の RNase DNase free Water でウイルス RNA を溶出した。RNA 抽出液は DNase I (Takara) で処理後、random hexamer (Amersham) および Super Script II RT (Invitrogen) を用いて逆転写を行い cDNA 作製し、4 μ l (ウイルス RNA 2 μ l に相当) を PCR に用いた。

3) NV の検出

リアルタイム PCR は影山らの方法 (Vita, 18, 2001) に従って、TaqMan Universal PCR Master Mix (ABI 社)、COG1F/R、RING1-TP(a)/(b) および COG2F/R、RING2-TP を用いて、ABI7700 (ABI 社) でリアルタイム PCR を行ない、遺伝子型 (genogroup 1:G1、genogroup 2:G2) 別にコピー数を測定した。ふん便の PCR は G1SKF/R、G2SKF/R を用いて行い、食品の PCR は COG1F/G1SKR、COG2F/G2SK を用いて 1st PCR を行った後、G1SKF/R、G2SKF/R を用いて 2nd を行った。

3) HAV の検出

リアルタイム PCR は、HAV+449/HAV-557 および HAV+482-TP を用いて、上記と同様に行った。PCR は V. Afaire-Marchais ら (Mol. Cell. Probes 8, 117-124, 1994) の方法に従って行った。

4) ウイルス遺伝子の系統解析

PCR で検出された遺伝子は、DTCS mixture (Beckman Coulter) を用いたダイレクトシーケンスにより、CEQ2000 で塩基配列を決定した。NV については得られた塩基配列と研究班の標準株の NS ドメインについて clustal X でアラ

イメントを作成後、NJ 法にてブースト ラップを行い系統解析した。HAV については、Blast search により DNA データベースを検索した。

C. 研究結果

1) ウイルス食中毒事例の発生状況

表 1 に、ウイルス性食中毒の疑われた事例の概要および検査結果を示した。34 事例中 22 事例が NV 食中毒事件で、22 事例中 8 事例はカキあるいは二枚貝の喫食を伴う食中毒事件であった。22 事例の NV 食中毒事件は、G1NV によるものが 4 事例、G2NV によるものが 13 事例、G1・G2NV 混合が 5 事例であった。NV 食中毒患者ふん便からの NV 検出状況は 69 検体中 54 検体で、G1NV のみ 5 検体、G2NV のみ 34 検体、G1・G2NV 混合 14 検体であった。8 事例の NV 食中毒事件から調理従事者ふん便が搬入され、3 事例の調理従事者ふん便から NV を検出した。NV 食中毒 4 事例から原因究明のために食材が 14 検体搬入されたが、NV を検出することは出来なかった。

2) 市販カキのウイルス汚染状況

市販カキは 1 ロットにつき、カキから摘出した中腸腺を 3 個個別に検査を行い、全て陰性の場合そのロットは陰性とした (表 2)。市販生食用カキは 12 月に、広島県産 12 ロット、宮城県産 5 ロット、兵庫県産 4 ロット、三重県産 2 ロット、岡山県産 1 ロット計 24 ロットを一斉に収去検査を行った。広島県産カキ 4 ロットから NV を検出し (G1・G2: 1 ロット、G2: 3 ロット)、そのうち 1 ロットから HAV を検出した。

広島県産の生食用カキおよび加熱調理

用カキを各1ロット、10月から12月に経時的に4回(計8ロット)購入した。12月に購入した生食用カキ1ロットからG2NVを検出した。

3) NVの遺伝的系統解析

NVの検出された患者ふん便から事件ごとに無作為に49検体を抽出し、NVの塩基配列を決定した。NV陽性カキからPCR陽性であった3検体について塩基配列を決定した。検出されたNVは研究班のスタンダード株をあわせて系統解析を行った(図1)。G1NV15株はC-3クラスター7株、C-5クラスター2株、C-7クラスター2株、C-6クラスター4株、G2NV37株はC-9クラスター4株、C-10クラスター11株、C-16クラスター10株、C-20クラスター3株、C-13クラスター3株、C-14クラスター1株、C-11クラスター1株、C-31クラスター4株で各クラスター内のNV株の遺伝子の相同性90%以上であった。

D. 考察

22事例のNV食中毒事件中、8事例はカキの喫食に伴う事例である、これらのカキは酢ガキなど生食以外にカキフライなど加熱調理されているものが含まれており、不十分な加熱調理が原因と考えられた。3事例の調理従事者ふん便からNVが検出されたが、従事者は患者と同じ食材を食しており原因とは断定できなかった。しかしながら、従事者ふん便からごく少量のNVが検出される場合と、患者と同程度の量のNVが検出される場合があり、ウイルス排泄量と感染経路について検討する必要があると考えられた。4事例から推定原因食材(3事例はカキを含む)が搬

入されたがNVは検出されなかった。今回、冷凍カキフライを原因とする食中毒事例が発生したが、NVは冷凍に対して抵抗性を有していることから、NV汚染食材を用いた冷凍食品によるNV食中毒に監視が必要であると考えられた。10月から12月に同一海域の生食用カキと加熱調理用カキを4回購入し、12月初旬に購入した生食用カキからNVを検出した。また、12月初旬に購入した市販生食用カキ24ロット中4ロット(16.7%)からNVを検出した。NV陽性5ロットの検出率は、1/3が3ロット、2/3が1ロット、3/3が1ロットで、カキ1個あたりのNV量(コピー数)は10個~400個であった。NV食中毒は細菌性食中毒とは異なり、数個から100個程度のウイルスの摂取で感染が成立すると言われており、これらのカキも生食した場合はNV食中毒の原因食品と成りえると考えられた。また、NV陽性の1ロットからHAVを検出した。個別の検査では検出できなかったが、3個プールするとリアルタイムPCR法では0.5コピー/プールであり、PCR法で検出したHAV塩基配列は遺伝子データベースに登録されているHAV(AB020567)と100%一致した。NV食中毒22事例中9事例からG1NVが、18事例からG2NVが検出され、近年の流行のとおりにG2NVが優勢であった。患者ふん便49検体から検出されたNVと市販カキ3検体から検出されたNVの系統解析から、これらのウイルスは11のクラスターに分類され、1事例から複数の遺伝子型のウイルスが検出される混合型の事例も認められ、流行するNVの遺伝子型の多様性が示された。市

販カキから検出された NV (OY5103G2NS) と患者ふん便から検出された NV (02198022G2NS、02198023G2NS、02202001G2NS) から相同性の高いウイルスが検出された。

E. まとめ

2002年4月から2003年2月の間に、22事例から Norwalk virus (NV) を検出した。8事例はカキの喫食に伴う事例であった。

市販カキ32ロットについて NV および A 型肝炎ウイルス (HAV) の検索を行い、5ロットから NV を検出し、1ロットから HAV を検出した。

冷凍カキフライを推定原因食とする事例が認められ、NV や HAV がカキから検出されたことから、冷凍二枚貝によるウイルス性食中毒の発生についても監視していく必要があると考えられた。

F. 研究発表

1) 論文発表

○入谷展弘、勢戸祥介、春木孝祐、川本尋義、西尾 治、久保英幸、村上 司、簗城昇次、瀧野 薫、綾田 稔、小倉 壽: 河川水からの *Norwalk virus* の検出、生活衛生 第46巻(4) 137-143 (2002)

○入谷展弘、勢戸祥介、春木孝祐、西

尾 治、久保英幸、村上 司、簗城昇次、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 調査・研究年報 平成13年度版 第64集、6-10 (2002)

2) 学会発表

○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 Alphanon 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)

○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)

○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)

○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)

表1 非細菌性集団胃腸炎発生状況

事例No.	発生日月	発生場所	原因施設	原因食品	猪首者数/ 喫食者数	色者 △/○ 人/人		食者 △/○ 人/人		検査成績			
						陽性数/ 検査数	陽性数/ 検査数	陽性数/ 検査数	陽性数/ 検査数	色者△/○ 人/人		検査成績	
										NV G1	NV G2	Sequence	NV G1
0012085	2002年4月	大阪市	調査中	調査中	2/5	1/2	-	-	1/2	0/2	C3	-	-
0012085	調査中	調査中	調査中	調査中	不明	0/1	-	-	0/1	0/1	-	-	-
0012129	調査中	調査中	調査中	調査中	不明	0/1	-	-	0/1	0/1	-	-	-
0012141	2002年8月14日	調査中	飲食店	惣菜料理	13/28	0/8	-	-	0/8	0/8	-	-	-
0012172	2002年9月	大阪市	施設事業	食品(力主)	5/28	5/9	0/8	0/2	1/5	5/5	C10, C13	0/3	0/3
0012181	調査中	大阪市	調査中	調査中	不明	-	0/3	-	-	-	-	0/3	0/3
0012182	調査中	調査中	調査中	調査中	不明	0/1	-	-	0/1	0/1	-	-	-
0012187	調査中	調査中	調査中	調査中	不明	-	0/5	-	-	-	-	0/5	0/5
0012189	2002年11月	大阪市	調査中	調査中	2/3	2/2	-	-	0/2	2/2	C13	-	-
0012196	調査中	大阪市	調査中	調査中	不明	-	3/8	-	-	-	-	0/8	3/8
0012198	2002年12月	大阪市	調査中	調査中	3/25	3/3	1/6	-	0/3	3/3	C9	0/6	1/6
0012202	2002年12月	大阪府	調査中	調査中	4/5	1/1	-	-	0/1	1/1	C9	-	-
0012204	調査中	大阪市	調査中	調査中	不明	-	0/15	-	-	-	-	0/15	0/15
0012207	調査中	調査中	調査中	調査中	不明	0/2	-	-	0/2	0/2	-	-	-
0013006	2003年1月	大阪市	調査中	不明(力主)	1/1	1/1	-	0/1	0/1	1/1	C10	-	-
0013008	2003年1月	大阪市	飲食店	主	7/28	1/1	0/8	-	0/1	1/1	C16	0/8	0/8
0013009	2003年1月	大阪市	調査中	不明(力主)	3/3	2/2	-	-	1/2	2/2	C10, 16, 21	-	-
0013011	2003年1月	大阪市	調査中	不明(力主)	1/1	1/1	-	-	1/1	0/1	C3	-	-
0013012	2003年1月	大阪市	調査中	不明(力主)	7/77	9/12	8/35	0/8	5/12	9/12	C3, 10, 16, 7	3/35	8/35
0013016	2003年1月	大阪市	調査中	惣菜(力主)	不明	0/1	0/6	-	0/1	0/1	-	0/6	0/6
0013017	2003年1月	大阪市	調査中	調査中	10/13	8/9	0/2	-	0/9	8/9	C20	0/2	0/2
0013018	調査中	大阪市	調査中	調査中	不明	0/1	0/2	-	0/1	0/1	-	0/2	0/2
0013020	2003年2月	他府県	調査中	不明(力主有)	3/?	1/1	-	-	1/1	0/1	C6	-	-
0013021	2003年2月	大阪市	不明	調査中	2/2	2/2	-	-	0/2	2/2	C10, 14	-	-
0013022	2003年2月	大阪市	飲食店	食品(力主有)	5/5	4/4	3/5	-	2/4	4/4	C3, 10, 7	1/5	3/5
0013024	2003年2月	大阪市	調査中	調査中	調査中	3/5	0/1	-	0/5	3/5	C16	0/1	0/1
0013026	2003年2月	他府県	調査中	調査中	調査中	2/2	-	-	0/2	2/2	C6, 16	-	-
0013027	2003年2月	大阪府	調査中	調査中	調査中	1/1	-	-	0/1	1/1	-	-	-
0013028	2003年2月	大阪市	調査中	調査中	調査中	1/1	-	-	0/1	1/1	C16	-	-
0013031	2003年2月	大阪市	調査中	調査中	調査中	-	-	0/3	-	-	-	-	-
0013034	2003年2月	和歌山県	調査中	調査中	調査中	3/3	-	-	3/3	3/3	-	-	-
0013035	2003年2月	大阪市	調査中	調査中	調査中	1/2	0/5	-	0/2	1/2	-	0/5	0/5
0013036	2003年2月	三重県	調査中	調査中	調査中	1/1	-	-	0/1	1/1	C10	-	-
0013037	2003年2月	大阪市	調査中	調査中	調査中	2/3	-	-	2/3	0/3	C7	-	-

表2 市販カキのウイルス検出状況

Sample name	養殖海域・産地	種類	採取日	Real time PCR [NV]		PCR [NV]	Sequence [NV]	Real time PCR [HAV]	PCR [HAV]	Sequence [HAV]
				G1	G2					
OY0201	広島県海域	生食用	12/9購入	1/3	1/3	陰性		陰性	陽性	AB020567
OY0202	兵庫県東福浦・虫明	生食用	12/9購入	陰性	陰性	NT		陰性	陰性	
OY0203	岡山県虫明海域	生食用	12/9購入	陰性	陰性	NT		陰性	陰性	
OY0204	広島県・呉湾 (能美島海域)	生食用	12/9購入	陰性	3/3	G2+	C-11	陰性	陰性	
OY0205	広島県海域	生食用	12/9購入	陰性	陰性	NT		陰性	陰性	
OY0206	広湾・広島県	生食用	12/9購入	陰性	陰性	NT		陰性	陰性	
OY0207	荻浜湾・宮城県	生食用	12/9購入	陰性	陰性	NT		陰性	陰性	
OY0208	兵庫県相生	生食用	12/9購入	陰性	陰性	NT		陰性	陰性	
OY0209	宮城県海域3	生食用	12/9購入	陰性	陰性	NT		陰性	陰性	
OY0210	追波湾・宮城県	生食用	12/9購入	陰性	陰性	NT		陰性	陰性	
OY0211	石巻湾西部	生食用	12/9購入	陰性	陰性	NT		陰性	陰性	
OY0212	宮城県海域3	生食用	12/9購入	陰性	陰性	NT		陰性	陰性	
OY0213	広島湾中部海域	生食用	12/9購入	陰性	1/3	陰性		陰性	陰性	
OY0214	兵庫県相生	生食用	12/9購入	陰性	陰性	NT		陰性	陰性	
OY0215	広島湾北部	生食用	12/9購入	陰性	1/3	G2+	C-20	陰性	陰性	
OY0216	広島県海域	生食用	12/9購入	陰性	陰性	NT		陰性	陰性	
OY0217	鳥羽海域・浦村	生食用	12/9購入	陰性	陰性	NT		陰性	陰性	
OY0218	広島湾南部	生食用	12/9購入	陰性	陰性	NT		陰性	陰性	
OY0219	鳥羽海域・浦村	生食用	12/9購入	陰性	陰性	NT		陰性	陰性	
OY0220	広島県海域	生食用	12/9購入	陰性	陰性	NT		陰性	陰性	
OY0221	広島湾中部海域	生食用	12/9購入	陰性	陰性	NT		陰性	陰性	
OY0222	宮島周辺海域	生食用	12/9購入	陰性	陰性	NT		陰性	陰性	
OY0223	兵庫県坂越海域	生食用	12/9購入	陰性	陰性	NT		陰性	陰性	
OY0224	広島湾中部・西部・呉湾	生食用	12/9購入	陰性	陰性	NT		陰性	陰性	
OY044	広島県中部海域	加熱用	10月末	陰性	陰性	NT		陰性	陰性	
OY045		生食用	10月末	陰性	陰性	NT		陰性	陰性	
OY046		加熱用	11月中	陰性	陰性	NT		陰性	陰性	
OY047		生食用	11月中	陰性	陰性	NT		陰性	陰性	
OY048		加熱用	11月末	陰性	陰性	NT		陰性	陰性	
OY049		生食用	11月末	陰性	陰性	NT		陰性	陰性	
OY050		加熱用	12月中	陰性	陰性	NT		陰性	陰性	
OY051		生食用	12月中	陰性	2/3	G2+	C-9	陰性	陰性	

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 海域および食品のウイルス汚染状況調査・研究

分担研究者 西 香南子 三重県科学技術振興センター保健環境研究部研究員

研究要旨

三重県内のカキ養殖海域を昨年度から1海域増やし、4海域5定点を定め、1定点につき5個のカキを採取し *Norwalk virus* (NV) 及び A 型肝炎ウイルス(HAV)の検査を実施した。3海域については海水 20L を採水し同じ項目について検査を実施した。カキの採取は12月16日から実施し、12月はすべてのカキで NV は検出されなかったが、海水温が 10℃を下回った1月8日の採取よりカキから NV が検出されはじめ、2月3日が最も多くのカキで NV が検出された。HAV については検査期間をとおしてすべての検体で検出されなかった。

2002年12月から当研究部に搬入されたウイルスが原因と疑われた事例9事例について検査を実施した。患者が県外であった1事例を除き、すべての事例で患者から NV が検出された。

A. 研究目的

三重県では1997年からカキ養殖海域に定点を定め、カキの NV 汚染について調査を行ってきた。食中毒等の発生状況から環境因子との関連性が推測されたことからカキの採取とともに海水温、海水比重等を測定し、NV によるカキの汚染状況の推測の可能性についても検討を行った。さらに NV は培養細胞が見つからないことから、食品のように少量のウイルスが汚染している場合の定量は不可能であったが、昨年より *realtime PCR* 法を行いカキ等の食品中の NV の定量を行った。また、NV はヒトでしか増殖しないと考えられていることから、2002年12月から当研究部に搬入されたウイルスが原因と疑われる事例

について検査を実施し、関連性について検討を行った。

B. 研究方法

1.採取期間及び検体

県内カキ養殖海域に昨年度から1海域を増やした4海域(A, B, C, D)に5定点(a, b-1, b-2, c, d)を定め、1回の採取で1定点につき5個のカキを採取した。採取は2002年12月16日から2003年3月3日まで7回行った。また、A, B, C海域は1月29日を除いてカキの採取時に海水20Lを採取し検査を実施した。

ウイルスが原因と疑われた事例については2002年12月より当研究部に検査依頼のあった9事例について検査を

実施した。

2.カキ及び食品の前処理

カキ及び貝類は中腸腺を摘出後9倍量のPBS(-)でホモジナイズし、遠心後上清に24% PEG/1.5M NaClを加え4℃一晩放置または室温で2時間攪拌した。3,000rpm, 30分遠心後、沈渣を10,000rpm, 20分遠心し、上清に24% PEG/1.5M NaClを加え4℃, 30分以上放置した。12,000rpm30分遠心し、沈渣をEagle's MEM 500 μ Lに浮遊しRNAの抽出に用いた。

その他の食品についてはPBS(-)10mLに4℃1時間浸漬し、浸漬液をカキ遠心上清と同様に処理を行った。

3.海水の前処理

海水の濃縮は昨年度実施した陰電荷膜法により実施した。フィルターからの濃縮液は amicon Centriprep Concentrator 50(MILLIPORE) で2500rpm, 10分遠心し、最終量が約1.5mLになるまで繰り返した。

4.糞便の前処理

事例で搬入された糞便は Eagle's MEM 500 μ L に10%乳剤になるように浮遊し、10,000rpm, 10分遠心後、上清をRNA抽出に用いた。

5.RNAの抽出及びcDNAの作製

RNAの抽出にはQIAamp Viral RNA Mini Kit(QIAGEN)を用い、プロトコールに従って処理をした。カキ等の食品や海水ではBuffer AVEを30 μ L, 事例の糞便検体では60 μ Lで最終の抽出を行った。

抽出したRNAはカキ等の食品や海

水では全量、糞便では24 μ LをDNase I(TaKaRa)で37℃, 30分反応させDNAを分解し、random hexamer(Amersham Pharmacia)を用いてカキ等の食品や海水では Super Script RT II(Invitrogen), 糞便検体ではM-MLV RT(Invitrogen)で42℃, 1時間反応させcDNAを合成した。

作製したcDNAはPCR法に使用するとともに、カキ等の食品や海水のcDNAについては埼玉衛生研究所においてrealtime PCRによる定量を行った。

6.PCR

カキ等の食品や海水のcDNAはNVについては昨年度と同様にPCRを実施した。糞便検体では capsid 領域の primer による検出を行った。使用した primer set のいずれかでバンドが認められたものをNV陽性とした。

HAVについては1st PCRにHAV+2795/HAV-3351, nested PCRにHAV+2903/HAV-3296を用いてPCRを行った。

陽性になったPCR産物は国立感染症研究所感染症情報センターにシーケンスを依頼した。

C. 研究結果

1.カキ及び海水のNV及びHAV検出結果

各定点で採取したカキのNVの検出結果を表1に示す。各定点では1回につき5個採取し、いずれかの primer set で陽性となった個数を示した。海水については海域A, Bで2月3日にG1-SK系の primer でPCR陽性となっ

た。

HAV については検査期間をとおして検出されなかった。

2.カキ採取時の気象状況

カキの採取時に海水温と1月29日を除いて海水比重の測定を行い、その結果を図1, 2に示した。また、海域の気温及び降水量については海域近辺の消防署の観測データを用い図3, 4に示した。気温については1日の平均気温を示した。

3.事例における検査結果

2002年12月から当研究部に搬入されたウイルスが原因と疑われた9事例について検査を行い、その結果を表2に示した。

事例3及び6については患者又は施設が県外のため疫学や検査結果等の詳細については不明であった。事例1では原因と疑われた食品は昼食弁当であり、食材に貝類の使用はなかった。事例2, 4~5, 6~9ではカキの関与が疑われた事例であった。事例8では散发事例であったが原因と疑われたカキとは別Lotのカキではあったが、患者から検出されたNVとカキから検出されたNVは遺伝子配列が近似していた。

4.検出されたNVの遺伝子解析

定点におけるカキ及びウイルスが原因と疑われた事例のNV検査の結果、検出されたNVのシーケンスを国立感染症研究所感染症情報センターに依頼し、事例については1から6まで、カキについては1月30日採取分までの系統解析結果を図5, 6に示す。

事例1では貝類の関与がない食中

毒事例であったが、患者及び従事者から検出されたNVはすべてMX類似株であり、ヒト-ヒトによる感染による事例であることが示唆された。また貝類の関与のあった事例については同じ事例の患者から様々なgenotypeが検出されており、従来からの報告と同様であった。

県内産カキの関与が疑われた事例で、患者と喫食したと推定されるカキと同時期に定点から採取したカキから検出されたNVのシーケンスが類似したものはなかった。しかし、事例2の患者は1月10日にカキを喫食しているが、約2週間後の1月20日に定点b-1で採取されたカキから検出されたNVとシーケンスが近似していた。

5.realtime PCRによる定量値

2002年12月から2003年2月17日に採取したカキから作製されたcDNAを埼玉衛生研究所に依頼しrealtime PCRによる定量を実施した。RT-PCR法の各prier set別にrealtime PCR法との相関性を表3, 4, 5, 6に示した。表中にはrealtime PCRの定量値が0copy/個は-, 0から100 copy/個を±, 100 copy/個以上を+として示している。昨年度においてもrealtime PCRで100copy未満の値については処理方法による差や再現性について検討の必要性があるとの報告であったが、今年度についても100copyを越える検体はG1, G2とも約20%であり、0から100 copy/個はG1では30%, G2では64.7%であった。RT-PCR法との相関性についてもRT-PCR法の判定はnested PCRあるのに対しrealtime PCR法では1st PCRで

あること、使用している primer や機器に違いがあること、RT-PCR 法で標的の遺伝子を増幅していない可能性があること等相関性について一致しない結果があった。

D. 考察

2002 年度のカキの検査では 1 月 8 日の採取から NV 陽性となり 2 月 3 日の採取がピークとなり、2 月 17 日以降もわずかながら NV が検出されている。今年度は 12 月 26 日から平均気温が 5°C を下回る日が多くなり、急速に気温が低下したところに 1 月 3 日に 50mm を超える降雨があった。このため 1 月 8 日の採取時には海水温が 10°C を切り海水比重の低下が認められた。今年度は昨年度よりも 1 月の平均気温が A 海域で 1.6°C、B 海域で 2.5°C 低く、さらに 1 月 27 日には A 海域で 86.5mm、B 海域で 126mm の降雨があったため、2 月 3 日の採取でピークとなったことが考えられた。しかし、海水の比重は計測値では降雨の影響は少なかった。

今年度より 1 海域を増やし 4 海域 5 定点での検査を行ったが、海域・定点別に見ると定点 a は昨年度と同様に NV 陽性となるカキは少なかった。これは海域内に流入する大きな河川が少なく、NV の流入が少なかったことが推察される。海域 B・C・D は伊勢湾に近い順に D・C・B となっており、伊勢湾から放出される海流が海域 D で分かれ C、B の順に流れており、検出時期や検出数については上流の方が先行することが考えられたが、今年度の調査では検出時期

は同じであり、検出数では最も下流の B 海域の定点 b-2 が最も検出数が多かった。

カキの養殖海域は冬季になると陸からの強い西風を受け海水表面の水温が低下によって海水の比重が重くなり海底の海水との比重差により垂直方向の対流が起こることが考えられる。また、西風が対流を増強していることも考えられ、降雨の影響を受けない状況では海底に沈んだ NV が対流によって舞い上がりカキを汚染していることが考えられる。しかし、大量の降雨により比重が軽く、多くの NV を含んだ河川水が海域に流入すると比重の重い海水の上に比重の軽い河川水がのる、いわゆる躍層が形成される。躍層は海水温の比重差で起こる対流の影響をほとんど受けないと考えられ、カキは継続して NV の汚染を受けることが推測される。当研究部で行った Poliovirus を用いた汚染・浄化実験において、長期間 Poliovirus の汚染を受けたカキでは完全な浄化ができなかったことから、躍層形成によって長期間 NV の汚染を受け、カキから NV が多く検出されたことが推測された。また定点 b-2 は海域 B の最も風下に位置しており、海域内の NV を含む海水が風によって定点 b-2 の方へ押し流され、定点内で最も NV 検出数が多くなったことが考えられた。

NV は陸上で流行し下水処理場等の放流水に含まれて海域が汚染されると考えられている。今年度感染症発生动向調査における NV の検出数、ウイルスが原因と疑われた事例数とカキにおけ

る NV の検出数を図 7, 8 に示す。図 7 ではカキから検出された NV は G1, 図 8 では G2 の数を示している。感染症発生動向調査では昨年度よりも 2 週早く NV の検出数にピークが見られたが、検出された NV はすべて G2 であった。また、この時期に発生した事例 1 についても検出された NV は G2 であり、遺伝子解析の結果もすべて MX 類似株であったことから事例 1 についてはヒト-ヒト感染による感染性胃腸炎の集団発生であったことが示唆された。しかし、昨年度では感染症発生動向調査でピークが認められた週の 6 週後からカキで NV が検出され、カキでの検出は陸上の流行をほぼ反映して G2 が検出されたが、今年度は感染症発生動向調査のピークが認められた週の 4 週後にカキから検出され、昨年度の間隔よりも 2 週短く、さらに陸上で検出されていた NV が G2 であったにもかかわらずカキで初期に検出された NV は G1 であった。カキで G1 が検出された頃には感染性のないものではないかと考えたが、採取時期の近いカキが原因と疑われた事例では患者から G1 が検出されており、感染性の維持された NV であったことが認められた。1 月 8 日の採取時にはすべての海域で G1 が検出されていることから、どこかでかなり多くの NV が増殖する因子があったことが考えられるが、現時点では今年度検出された G1 の感染環については不明である。カキで G2 が検出される時期は感染症発生動向調査のピークとの間隔は昨年度とほぼ同じであったことから、G2 については陸上の流行を反映し

たものであることが示唆された。

ウイルスが原因と疑われた事例では事例 1 はヒト-ヒト感染が示唆された事例であったが、カキの関与が疑われた 6 事例のうち県内産カキであったものは 3 事例であり 1 月に出荷されたものであった。事例でカキの関与が疑われるものは検出される NV の genotype が一致しないことが多いという報告があり、今年度の結果についても同様であった。しかし、事例 2 で患者から検出された NV と定点 b-1 のカキで検出された NV は採取日は約 2 週間異なっているが、近似のシークエンスをもった NV が検出されている。この genotype はヒト-ヒト感染が示唆された事例 1 と類似のシークエンスであることから、県内で広く流行が見られた株で継続的に海域を汚染していたか、流入した NV が 2 週間の海域に存在した可能性が考えられた。事例 8 では B 県産の生食用カキが原因と疑われた事例で、患者が喫食したカキとは別 Lot のカキであったが、患者とカキから検出された NV の genotype は Chiba407 類似株であり、近似のものであった。2 月以降カキの NV 検出数が増加したにも関わらず県内・県外とも事例の発生が少なかったのは、今年度よりカキの定点における NV の検出数や海水温、降雨量、陸上での NV の流行状況、海域プランクトンにおける NV の検出状況、海域カキによる事例等の発生や調査の状況をもとにカキ養殖業者に情報提供を行い、出荷カキの用途を自主的な判断で加熱調理用にしたこと等が要因であることが推察される。

NV の realtime PCR による定量を昨年度より実施しているが、RT-PCR 法との相関性が RT-PCR 法の判定が nested PCR あるのに対し realtime PCR 法では 1st PCR であること、使用している primer や機器に違いがあること、RT-PCR 法で標的の遺伝子を増幅していない可能性があること等一致しない結果があった。また realtime PCR 法の検出限界よりもカキなどの食品に含まれている NV 量が少ないことが考えられ、今後さらに少量の NV の定量方法について検討をしていく必要があると考えられた。また同時期、同海域で採取したカキにおいても定量値に 10~100 倍の差があり、個体差による NV 量に差があることが認められた。

E. 結論

今年度の定点のカキにおける NV 汚染状況は昨年度のよりも A 海域を除いて高かったことから、海水温、降雨量などの環境因子においてカキの汚染状況を推測できることが確認された。このことから今年度よりカキ養殖地域を管轄に持つ保健所で試行的に養殖業者へ情報提供を行った。養殖業者は自主的な判断によりカキでの NV 汚染が高い時期には加熱調理用にしたり、生食用の出荷を控えたりしたこと等によって事例の発生を減らすことができたと考えられる。情報提供を行うことによって予期せぬ風評被害を引き起こす可能性があり、今年度は養殖業者へ情報提供を行った。今後、提供先を含めて情報提供のあり方を検討していくとともに、確実な浄

化方法の確立をすることが重要であると考える。

ウイルスが原因と考えられる事例の発生のうちカキを原因とする事例が減少してもヒト-ヒト感染が疑われる事例は発生することが考えられるが、現在は感染量が少ないこと等から患者以外から検出されることは少ない。しかし、今後、realtime PCR 法等の検査法の開発によって感染量を含めて事例の積み重ねによって解明されると考える。

F. 研究発表

1. 論文発表

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, 2002, 47:41-46.

2. 学会発表

西 香南子, 松野重夫, 西尾治: カキおよび養殖海域の Norwalk virus 調査と環境因子との関連性, 第 50 回日本ウイルス学会, 札幌市, 2002.

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オ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, 札幌市, 2002.

杉枝正明, 大瀬戸光明, 福田伸治, 川本歩, 木村博一, 三上稔之, 西田知子, 新川奈緒美, 西 香南子, 古屋由美子, 西尾治: 全国各地で発生したノーウオ

ークウイルス(NV)による食中毒事例に
ついて, 第 50 回日本ウイルス学会, 札

幌市, 2002.

表1 定点カキにおけるNV検出数(2002年度)

	12/16	1/8	1/20	1/29	2/3	2/17	3/3
定点a	0	2	1	1	2	2	2
定点b-1	0	1	2	2	3	1	0
定点b-2	0	3	4	3	5	2	1
定点c	0	3	2	2	3	0	0
定点d	0	1	2	3	2	0	1

※ 定点につき5個/回採取

表2 ウイルスが原因と疑われた事例

事例	発生日	原因食(疑)	検査数※	NV検出数※			genotype
				G1	G2	G1&2	
1	12/14	昼食弁当	14(3)	14(1)			MX
2	1/16	県内産カキフライ(疑)	6(6)	1	(1)	4	Winchester, Musgrove MX, DSV395orStav/95, Hilligdon
3	1/13	バーベキュー(疑)	0(13)				—
4	1/16	県内産カキ(疑)	9(6)	6			Winchester, Musgrove
5	1/18	A県産カキ(疑)	9(3)	4		1	Chitta or Hawaii, Miami/292 Lordsdale
6	不明	不明	1			1	Winchester, MX
7	1/20	県内産カキ(疑)	3(7)	3			(検査中)
8	2/7	B県産カキ(疑)	1			1	Chiba407, Hilligdon
9	2/14	C県産カキフライ(疑)	27	19		3	(検査中)

※ ()内は従事者数

表3 RT-PCR(G1-SK)とrealtime PCRの相関性

		realtime PCR			
		-	±	+	計
RT-PCR (G1-SK)	-	69	40	15	124
	+	6	5	15	26
	計	75	45	30	150

表4 RT-PCR(COG1)とrealtime PCRの相関性

		realtime PCR			
		-	±	+	計
RT-PCR (COG1)	-	68	39	15	122
	+	7	6	15	28
	計	75	45	30	150

表5 RT-PCR(G2-SK)とrealtime PCRの相関性

		realtime PCR			
		-	±	+	計
RT-PCR (G2-SK)	-	20	76	21	117
	+	2	21	10	33
	計	22	97	31	150

表6 RT-PCR(COG2)とrealtime PCRの相関性

		realtime PCR			
		-	±	+	計
RT-PCR (COG2)	-	21	85	25	131
	+	1	12	6	19
	計	22	97	31	150

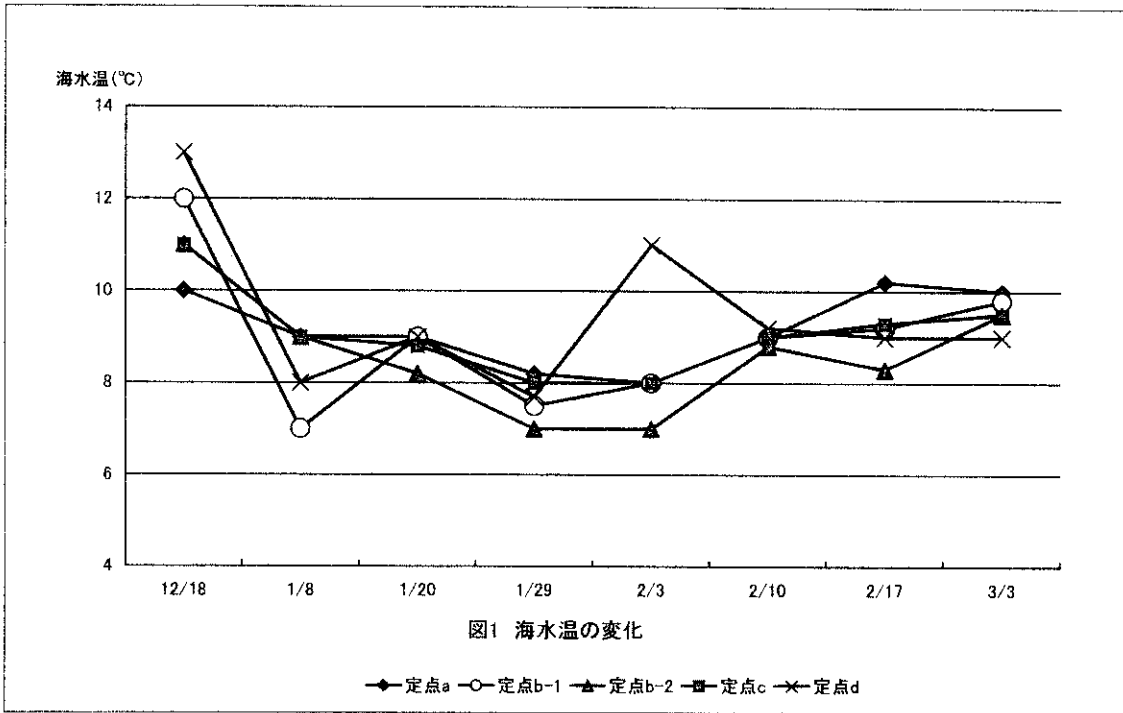


図1 海水温の変化

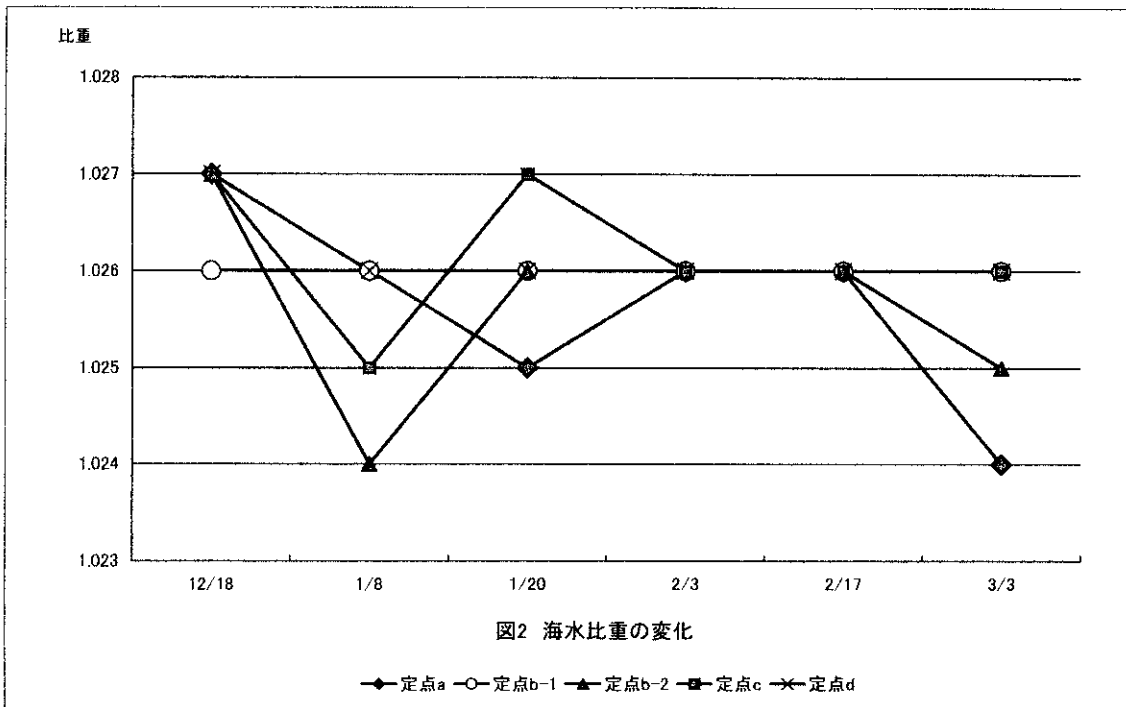


図2 海水比重の変化