

およびアサリ 1 検体、計 65 検体からの NVs および HAV、また 65 検体のうち 50 検体で HEV 遺伝子の検出を RT-PCR で試みた。

赤貝 29 検体中 2 検体 (6.9%)、ハマグリ 20 検体中 2 検体 (10.0%) から Genogroup I、赤貝 29 検体中 5 検体 (17.2%)、ハマグリ 20 検体中 3 検体 (15.0%)、タイラ貝 7 検体中 1 検体 (14.3%)、アサリ 1 検体中 1 検体 (100%) から Genogroup II の NVs 検出されたが、HAV および HEV は検出されなかった (表 3)。

表 3. RT-PCR 法による NVs、HAV および HEV 遺伝子の検出状況

種類	NVs(I)	NVs(II)	HAV	HEV
赤貝	2/29	5/29	0/29	0/19
ハマグリ	2/20	3/20	0/20	0/17
タイラ貝	0/7	1/7	0/7	0/6 ^{正後}
カキ	0/4	0/4	0/4	0/4
エビ	0/3	0/3	0/3	0/3
アオヤギ	0/1	0/1	0/1	0/1
アサリ	0/1	1/1	0/1	NT

8. 輸入食品の検査状況 (リアルタイム PCR)

輸入食品の 65 検体を、リアルタイム PCR で NVs、HAV 遺伝子の検出およびウイルス量を定量した。

赤貝 29 検体中 4 検体 (13.8%)、ハマグリ 20 検体中 3 検体 (15.0%)、タイラ貝 7 検体中 2 検体 (28.6%)、アサリ 1 検体中 1 検体 (100%) から NVs が検出され、そのウイルス量は $69.9 \sim 6.2 \times 10^3$ copies/g の範囲であった。HAV は、赤貝 29 検体中 1 検体 (3.4%) から検出され、ウイルス量は 6.5×10^2 copies/g であった。(表 4、5)

表 4. リアルタイム PCR による NVs、HAV 遺伝子の検出

種類	NVs(I)	NVs(II)	HAV
赤貝	0/29	4/29	1/29
ハマグリ	0/20	3/20	0/20
タイラ貝	0/7	2/7	0/7
カキ	0/4	0/4	0/4
エビ	0/3	0/3	0/3
アオヤギ	0/1	0/1	0/1
アサリ	0/1	1/1	0/1

表 5. リアルタイム PCR により検出された NVs 遺伝子のウイルス量

種類	ウイルス量 (copies/g)
赤貝	$69.9 \sim 2.0 \times 10^3$
ハマグリ	$1.2 \times 10^2 \sim 1.7 \times 10^3$
タイラ貝	$33.5 \sim 6.6 \times 10^2$
アサリ	6.2×10^4

D. 考察

2002 年 1 月から 12 月の期間に、静岡県内発生した食中毒事例は、27 事例が報告されている。

この発生事例は食品衛生法が平成 9 年 5 月改定後、毎年、第一位を NVs (SRSV) が占めている。本年も 27 事例中 11 事例 (40.7%) が NVs により発生していることを確認し、これまでの発生状況と同様であったことが確認された。

9 事例の食中毒事例における患者・調理従事者および拭き取り材料を対象に、RT-PCR 法による NVs 遺伝子の検出を試み、患者糞便 106 検体中 64 検体 (60.4%) から NVs 遺伝子を検出した。

遺伝子型別では、1 事例が Genogroup I、3 事例が Genogroup I + Genogroup II の混在、5 事例が Genogroup II で発生しており、この発生状況を施設、原因食品 (推定食品) 別から要因を特定するまでには至らなかったが、混在で発生した 2 事例は、生カキ、シジミの貝類が原因食品としての関与していたことが疫学調査で確認された。また、発生事例の原因究明について食中毒事例から検出された NVs 遺伝子の解析およびウイルス量を検索した。患者糞便およびトイレの取っ手、マカロニサラダから SMV/76/US が、社員食堂を原因として発生した事例から検出された。ウイルス量はトイレの取っ手が 9.3×10^4 copies/g、マカロニサラダから 8.8×10^3 copies/g 量が確認され、トイレは調理従事者が専用で使用、マカロニサラダは昼食弁当に約 100g が入っており、感染につながる十分なウイルス量がトイレの取っ手から調理従事者を介して、食品汚染 (マカロニサラダ) したことが考えられ、施設内外を含めた衛生状態を十分に把握し、管理する必要性がある。

る。

また、Lordsdale/93/UK が原因で発生した事例では原因施設での食品残品が入手が出来ず、調理場内の拭き取り材料が用が搬入された。これらの材料中、排水溝を拭き取った検体から同一の遺伝子が検出され、調理場汚染があったものと考えられた。

さらに、NVs 感染による感染率は、数々の食中毒事例で報告されているが、喫食者全員が発症している事例は少ない。その要因として血液型との関係が報告されていることから、食中毒事例の 1 集団を対象に発症者（日本人）を調査した。喫食者 2,462 名中 215 名（発病率 8.8%）の NV (Lordsdale/93/UK) による 121 名で、血液型、性別による発症者に有意差は見られず、A、B、O、AB の型別以外の血球の表現型

(A1、Aint、A2、A3、Am、Ax、B、B2、Bm、Bx) 分泌型の唾液中の型物質が関係している可能性が考えられ、非発症者での実態把握も必要と思われる。

食中毒事例の患者糞便、吐物および調理従事者（非発症者）から排泄されるウイルス量を把握することは重要である。

そこで、食中毒事例の発病初期（1～9 日）に採取された患者糞便、吐物、食中毒の原因施設と断定された調理従事者（非発症者）の糞便を患者の発生時点から継続的に採取した。患者の糞便（3～9 日）、吐物（1～3 日）では、 $1.3 \times 10^4 \sim 2.8 \times 10^9$ copies/g、調理従事者便で（1～5 日）後で $6.4 \times 10^4 \sim 1.1 \times 10^7$ copies/g、6～9 日後で $6.0 \times 10^3 \sim 9.61 \times 10^4$ copies/g、10～15 日後で $9.0 \times 10^4 \sim 9 \times 10^7$ copies/g の範囲で出され、二次感染・環境汚染が示唆されるウイルス量が存在していた。

輸入食品は、2001 年 11 月～2003 年 1 月の期間に東南アジア諸国の中国、韓国、北朝鮮、タスマニアで生産された赤貝 29 検体、ハマグリ 20 検体、タイラ貝 7 検体、カキ 4 検体、エビ 3 検体、アオヤギ 1 検体、アサリ 1 検体、計 65 検体からの NVs、HAV の汚染状況を RT-PCR で試み、HAV 遺伝子は検出されなかったが、NVs が冬季に輸入された赤貝 4 検体、ハマグリ 3 検体から検出された。また、HEV の汚染状況は、65 検体の中の赤貝 19 検体、ハマグリ 17 検体、タイラ貝 6 検体、カキ 4 検体、エビ 3 検体、アオヤギ 1 検体の計 50 検体で

RT-PCR を試み、HEV 遺伝子は検出されなかった。

そして、同材料 65 検体をリアルタイム PCR で実施した検索でも赤貝 4 検体、ハマグリ 3 検体、タイラ貝 2 検体から、NVs が検出されており、これらの食品中に含まれるウイルス量は、赤貝で $69.9 \sim 2.0 \times 10^3$ copies/g、ハマグリで $1.2 \times 10^2 \sim 1.7 \times 10^3$ copies/g、タイラ貝で $33.5 \sim 6.6 \times 10^2$ copies/g、アサリ 6.2×10^4 copies/g の範囲で検出され、これらの食品によるウイルス感染が示唆されることから、ウイルス汚染、拡大を防止するため、流通過程における検査体制の整備、食中毒事例などでの輸入食品の使用実態調査が重要と思われる。

E. 結論

諸外国から輸入されている赤貝、ハマグリ、タイラ貝、カキ、エビ、アオヤギおよびアサリを対象に、RT-PCR、リアルタイム PCR で NVs、HAV および HEV 汚染を調査した。

RT-PCR でハマグリ 3 検体（15.0%）、赤貝 6 検体（20.7%）、タイラ貝 1 検体（14.3%）、アサリ 1 検体（100%）から NVs 遺伝子が検出された。

リアルタイム PCR では、赤貝 4 検体（13.8%）、ハマグリ 3 検体（15.0%）、タイラ貝 2 検体（28.6%）、アサリ 1 検体（100%）から NVs が検出されから NVs 遺伝子が検出された。そして、これらの食品中に含まれるウイルス量は、赤貝で $69.9 \sim 2.0 \times 10^3$ copies/g、ハマグリで $1.2 \times 10^2 \sim 1.7 \times 10^3$ copies/g、タイラ貝で $33.5 \sim 6.6 \times 10^2$ copies/g、アサリ 6.2×10^4 copies/g の範囲で検出された。

HAV はリアルタイム PCR において、赤貝 1 検体（3.4%）から検出され、ウイルス量は 6.5×10^2 copies/g であった。

しかし、HEV 汚染は RT-PCR で検出されず、確認されなかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Masaaki Sugieda, Setsuko nakajima : M, Masaaki, Viruses detected in the

Caecum Contents of healthy pigs
representing a new genetic cluster
in genogroup II of the genus
Norwalk-like viruses. V. Research.
2002;165-172

2) 杉枝正明、佐原啓二、稲吉 恵、秋山真人：
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．2001,44,5-8

2. 学会発表

杉枝正明、大瀬戸光明、川本 歩、古屋由美
子、西 香南子、木村博一、福田伸治、新川奈
緒美、西尾 治：全国各地で発生したノーウォ
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、
10 月．

G. 知的所有権の出願・登録状況

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の評価に関する研究

分担研究項目 輸入食品のウイルス汚染状況調査・研究

分担研究者 古屋由美子 神奈川県衛生研究所

研究協力者 田中俊光 千葉市保健所

研究要旨

検査した輸入生鮮食品は45検体中6検体がノーウォークウイルス（NV）に汚染されていることが明らかになった。NVが検出されたのは、中国産ハマグリ、アカガイ、タイラガイ、韓国産タイラガイであり、ウイルスの定量値は中腸線1gあたり428から8185コピーであった。A型肝炎ウイルス（HAV）は検出されなかった。平成14年10月から平成15年2月に神奈川県域で発生した食中毒事例はすべての事例でNV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14年4月から11月まで、平成15年1月の各月5検体ずつ合計45検体の中国、韓国、北朝鮮およびタスマニアからの二枚貝41検体およびインド、インドネシアおよびミャンマーからの

エビ類4検体、計45検体について検査した。二枚貝は中腸線、エビ類は背腸を約1g、1検体につき3回取り出し、10%乳剤を作製し一部（500 μ l）を感染症研究所で培養細胞法によりウイルス分離を行った。残りは全てを超遠心でウイルス濃縮を行い、沈渣全てにリン酸緩衝液を加え140 μ lとし、このウイルス濃縮液全てからQIAamp Viral RNA Mini Kit(Qiagen)を用いてRNAを抽出した。RNAはDNAse処理後、ランダムプライマーを用いたRT反応によりcDNAを作製した。Nested PCRによりNVおよびSHAVの検出を行うとともにReal time PCRによりNVおよびHAVのウイルスの定量を行った。1検体につき3回検査を行い1回でも陽性であったものを陽

性とした。

2) 食中毒発生状況

平成14年10月から平成15年2月までに神奈川県で発生した食中毒7事例について患者、従事者および原因食品についてRNAを抽出した後、cDNAを作製し、NVに対するRT-PCRおよびReal time 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)

RT-PCRで検査した45検体はNVおよびHAVともに検出されなかった。Real time PCRでは45検体中、4月の中国産ハマグリ1検体(NVのG1で428コピー/中腸線1g)、5月の韓国産タイラガイ1検体(NVのG1で438コピー/g)、7月の中国産アカガイ1検体(NVのG1で929コピー/g)、10月の中国産ハマグリ1検体(NVのG1で8185コピー/g)と中国産アカガイ1検体(NVのG2で4019コピー/g)、1月の中国産タイラガイ(NVのG1で6628コピー/g、G2で7129コピー/g)、合計6検体(13.3%)からNVが検出された。しかしHAVはReal time PCRでも検出されなかった。

(2) 国別検出状況 (表2)

国別では中国産の28検体中5検体(17.9%)、韓国産は6検体中1検体(16.7%)からNVが検出された。しかし北朝鮮産の4検体、インド、インドネシアおよびミャンマーからのエビ類4検体、タスマニアからのカキ3検体からは検出さ

れなかった。

2) 食中毒発生状況 (表3、4)

平成14年10月から平成15年2月の間に神奈川県で7事例の集団発生が見られた。

原因食材はカキと考えられたものが3事例で不明が4事例であった。原因食材が不明の4事例は病院、特別養護老人ホーム、自宅および飲食店での発生であった。すべての集団発生の患者からNVG2が検出された。また従事者の便では4事例からNVが検出され、1名がNVG1であった以外はすべてNVG2であった。

食材は2事例から得られたが、実際に料理として出されたものはなく、飲食店等に残っていたカキの別ロットのものを検査したが全て陰性であった。

D. 考察

輸入生鮮食品はRT-PCRではウイルスは検出されなかったが、Real time PCRでは13.3%がNVに汚染されていることが示された。RT-PCRとReal time PCRの結果が不一致であったのは検出感度がRT-PCRよりReal time PCRの方が高かったためと考えられた。

輸入生鮮食品が汚染されていたことから、これら汚染された食品による食中毒発生の危険があると考えられた。

食中毒発生事例ではカキが原因食材と考えられたものを除いて、原因食材は不明であり、今後貝や生鮮食品以外の食材についてウイルス粒子の精製、濃縮法を検討し、原因食品の

判明につとめることが重要であると考えられた。また感染経路の解明のためにも同ロットの食材を検査する必要があり、飲食店等では食材を確保しておく必要があると考えられた。

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、NVに汚染されているものが13.3%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。

F. 研究発表

1. 学会発表

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、札幌、2002

表1 輸入食品月別汚染状況

月	原産国	種類	検体数	Real Time PCR*		
				NV		HAV
				G1	G2	
4月	中国	アカガイ	1	0	0	0
		ハマグリ	1	428	0	0
	韓国	タイラガイ	1	0	0	0
	インドネシア	ブラックタイガー	1	0	0	0
	タスマニア	カキ	1	0	0	0
5月	中国	アカガイ	1	0	0	0
		ハマグリ	1	0	0	0
	韓国	タイラガイ	1	438	0	0
	インド	ブラックタイガー	1	0	0	0
	ミャンマー	ブラックタイガー	1	0	0	0
6月	中国	アカガイ	1	0	0	0
		ハマグリ	1	0	0	0
	韓国	タイラガイ	1	0	0	0
	タスマニア	カキ	1	0	0	0
	インドネシア	ブラックタイガー	1	0	0	0
7月	中国	アカガイ	2	929	0	0
		ハマグリ	1	0	0	0
	北朝鮮	ハマグリ	1	0	0	0
	タスマニア	カキ	1	0	0	0
	8月	中国	ハマグリ	3	0	0
		アカガイ	2	0	0	0
9月	北朝鮮	ハマグリ	1	0	0	0
	韓国	タイラガイ	1	0	0	0
	中国	アカガイ	2	0	0	0
ハマグリ		1	0	0	0	
10月	韓国	タイラガイ	1	0	0	0
	中国	ハマグリ	1	8185	0	0
		アカガイ	2	0	4019	0
	北朝鮮	アカガイ	1	0	0	0
11月	中国	ハマグリ	1	0	0	0
		アカガイ	2	0	0	0
	韓国	タイラガイ	1	0	0	0
	北朝鮮	ハマグリ	1	0	0	0
1月	中国	タイラガイ	1	6628	7129	0
		ハマグリ	2	0	0	0
		アカガイ	2	0	0	0

*: 結果は中腸線1gあたりのコピー数を示す

表2 輸入食品国別汚染状況

原産国	種類	検体数	陽性数	Real Time PCR*		
				NV		HAV
				G1	G2	
中国	アカガイ	15	2	929	4019	0
	ハマグリ	12	2	428 ; 8185	0	0
	タイラガイ	1	1	6628	7129	0
韓国	タイラガイ	6	1	438	0	0
北朝鮮	アカガイ	1	0	0	0	0
	ハマグリ	3	0	0	0	0
インド	ブラックタイ	1	0	0	0	0
インドネシ	ブラックタイ	2	0	0	0	0
ミャンマー	ブラックタイ	1	0	0	0	0
タスマニア	カキ	3	0	0	0	0

*:結果は中腸線1gあたりのコピー数を示す

表3 食中毒発生状況

事例番号	発生日	発生地	原因施設	原因食品	発病者数/喫食者数
1	2002.10.25	小田原市	病院	不明	107/506
2	2002.11.25	秦野市	小売店	カキ	4/4
3	2002.12.14	茅ヶ崎市	飲食店	カキ	7/14
4	2002.12.15	平塚市	特別養護老人ホーム	不明	35/98
5	2003.1.20	藤沢市	自宅	不明	9/11
6	2003.1.21	鎌倉市	飲食店	カキ	
7	2002.2.17	厚木市	飲食店	不明	7/70

表4 食中毒事例検査結果

事例番号	検体名	検体数	Real time PCR 陽性数	NV 型
1	患者便	34	25	G2
	従事者便	30	7	G2
2	患者便	2	2	G2
	従事者便	6	0	
	食品	2	0	
3	患者便	12	9	G2
	従事者便	28	0	
	食品	6	0	
4	患者便	11	8	G2
	患者吐物	13	7	G2
	従事者便	14	3	G2
5	患者便	4	4	G2
	従事者便	11	3	G1,G2*
6	患者便	9	9	G2
	従事者便	2	0	
7	患者便	3	3	G2
	従事者便	13	3	G2

*G1陽性数:1、 G2陽性数:2

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
輸入食品からのウイルス分離に関する研究

協力研究者 国立感染症研究所 長谷川 斐子
主任研究者 国立感染症研究所 西尾 治

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。貝、エビ類50検体中細胞変性を示す因子は検出されなかった。しかし、これだけでは海産物中のウイルス汚染がないとはいいきれず、さらに検査を続ける必要がある。

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：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、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（24well plate）2穴に接種し、37Cで1時間吸着させる。接種検体を除き、維持培地

を1mlずつ加えて37Cの炭酸ガスフラスコ内で培養する。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。CPEが観察されれば、さらに1代培養し同定する。

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。

C. 研究結果

神奈川県衛生研究所からの50検体からウイルス分離を試みたが、CPEを示す検体はなかった。

D. 考察と結論

50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たが、CPEを示すウイルスは分離されなかった。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が、今回は分離されなかった。しかし検体数も少なく、さらに調査を続ける必要性があるとかんがえている。なお、他に24検体について検査中である。

E. まとめ

中国、韓国からの生鮮魚介類から組織培養によるウイルス分離を試みた。全て陰性であった。

F. 研究業績

1. 発表論文

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

藤本継人、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.

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

2. 学会発表

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

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

表 1. ウイルス分離結果

	品名	採取国	細胞		
			Hep2	RD-18S	GL-37
01-SF-1	赤貝(天然)	韓国	—	—	—
01-SF-2	赤貝(養殖)	韓国	—	—	—
01-SF-3	ハマグリ(養殖)	中国	—	—	—
01-SF-4	平貝(養殖)	韓国	—	—	—
01-SF-5	ハマグリ(養殖)	中国	—	—	—
01-SF-11	赤貝(天然)	韓国	—	—	—
01-SF-12	ハマグリ(養殖)	中国	—	—	—
01-SF-13	ハマグリ(養殖)	中国	—	—	—
01-SF-14	赤貝(養殖)	韓国	—	—	—
01-SF-15	平貝(養殖)	韓国	—	—	—
01-SF-16	赤貝(天然)	韓国	—	—	—
01-SF-17	ハマグリ(養殖)	中国	—	—	—
01-SF-18	赤貝(養殖)	韓国	—	—	—
01-SF-19	平貝(養殖)	韓国	—	—	—
01-SF-20	ハマグリ(養殖)	中国	—	—	—
01-SF-22	赤貝(養殖)	韓国	—	—	—
01-SF-24	ハマグリ(養殖)	中国	—	—	—
01-SF-25	ハマグリ(養殖)	中国	—	—	—
01-SF-26	赤貝(天然)	韓国	—	—	—
01-SF-27	赤貝(養殖)	韓国	—	—	—
01-SF-28	赤貝(養殖)	韓国	—	—	—
01-SF-29	赤貝(養殖)	韓国	—	—	—
01-SF-30	アサリ(養殖)	韓国	—	—	—
01-SF-31	ハマグリ(養殖)	中国	—	—	—
01-SF-32	平貝(養殖)	韓国	—	—	—
01-SF-33	赤貝(養殖)	韓国	—	—	—
01-SF-34	赤貝(天然)	韓国	—	—	—
01-SF-35	ハマグリ(養殖)	中国	—	—	—
01-SF-36	赤貝(天然)	韓国	—	—	—
01-SF-37	赤貝(養殖)	韓国	—	—	—
01-SF-38	ハマグリ(養殖)	中国	—	—	—
01-SF-39	赤貝(養殖)	韓国	—	—	—

01-SF-40	ハマグリ(養殖)	中国	—	—	—
01-SF-41	赤貝(天然)	韓国	—	—	—
01-SF-42	赤貝(養殖)	韓国	—	—	—
01-SF-43	ハマグリ(養殖)	中国	—	—	—
01-SF-44	ハマグリ(養殖)	中国	—	—	—
01-SF-45	ハマグリ(養殖)	中国	—	—	—
横浜0	アサリ		—	—	—
横浜1	アサリ	中国	—	—	—
横浜2	アサリ	中国	+	—	—
横浜3	アサリ	北朝鮮	—	—	—
横浜4	アサリ	中国	—	—	—
横浜5	アサリ	北朝鮮	—	—	—
横浜6	アサリ	北朝鮮	—	—	—
横浜7	アサリ	中国	—	—	—
横浜8	アサリ	中国	—	—	—
横浜9	アサリ	中国	—	—	—
横浜10	アサリ	中国	—	—	—

平成 14 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質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 兵庫県立健康環境科学研究所 センター 感染症部 主任研究員
協力研究者 近平雅嗣 同 主任研究員
吉田 弘 国立感染症研究所 ウイルス二部 主任研究員

研究要旨 輸入食品（海産物）119 件をウイルス分離試験(RD-18S、Hep-2 および GL37) およびエンテロウイルス用の RT-nested PCR で試験した。その結果、ウイルス分離 およびウイルス遺伝子検出ともに陰性であり、輸入海産物のエンテロウイルス等 による汚染頻度は低いことが示唆された。しかし、本研究の一部として進めている研究 で、我々は国外の下痢症患者から日本で流行していないタイプのエンテロウイルス を分離していて、それらの国内で抗体保有率が低いことが予想されるウイルスが国内 に侵入する経路として輸入食品は軽視できないと考えられた。

A. 研究目的

輸入食品について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。さらに、培養細胞の感受性 等の原因で補足出来ないエンテロウイルス の存在を検知するために RT- nested PCR による検査も実施する。

B. 研究方法

検体

119 検体 [中国 (64 件)、韓国 (43 件)、 北朝鮮 (5 件)、オーストラリア：タスマニ ア (4 件)、不明 (1 件) から輸入された貝 類 117 件および中国から輸入されたエビ 2 件] を用いた。検体は 2002 年 3～10 月に

愛媛県(79 件)または静岡県(40 件)で購入さ れ処理された乳剤を用いた。

検査方法

3 種類の細胞 (RD-18S、Hep-2 および GL37) によるウイルス分離および RT-nested PCR によるウイルス遺伝子の 検出を行った。なお、GL37 細胞は国立感 染症研究所の戸塚敦子博士が A 型肝炎ウイ ルスを分離することを目的にサル腎細胞を クローニングして開発した細胞で、ほとん どのエンテロウイルスに感受性があるとさ れる。維持液の交換さえすれば 1 ヶ月は充 分に維持できる細胞である。この細胞は継 代を続けると感受性が変化するため、国立 感染症研究所から分与を受けたものをでき だけ少ない継代数で用いた。

ウイルス分離は 24 ウェルマイクロプレートを用いて 3 週間、盲継代をして細胞変性(CPE)を観察した。CPE 様の変化が細胞に見られた場合、上清を取って Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) または High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche)を用いて RNA を抽出した(後者はインヒビター・リムーバル・バッファーを用いて反応阻害物質の除去を行った)。抽出 RNA について後述の RT-PCR (または RT-nested PCR) でエンテロウイルス遺伝子の有無を調べた。検体から直接 RNA を抽出して同様に RT-nested PCR を実施した。

RT-PCR は当初、簡便性が高い Ready-To-Go RT-PCR Beads(ファルマシア)を用いて検討したが、臨床検体から直接抽出したエンテロウイルス RNA でこのキットで陰性のものが SuperScript One-Step RT-PCR with Platinum *Taq* (Invitrogen)を用いるとはっきりと陽性になるケースが複数見られたため、すべての検体を後者のキットで試験した。RT-PCR 反応は篠原ら¹⁾の方法に準じて行い、プライマーは次のものを(P-2+E31,E33)で用いた。

P-2

(5'-CCTCCGGCCCCCTGAATGCGGCTAA
T-3')

E31

(5'-TCT GGT AAC TTC CAC CAC CA-3')

E33

(5'-TCT GGG AAT TTC CAG TAC CA-3')

Nested-PCR は石古ら²⁾および清水ら³⁾の方法に準じて実施した。その際に用いた

プライマーは次のものを (EVP4+OL68-1,OL68-71R) で用いた。反応は *Ex Taq* (宝酒造)を用いて行った。

EVP4

(5'-CTACTTTGGGTGTCCGTGTT-3')

OL68-1 (5'-GGT AAY TTC CAC CAC
CAN CC3') Y=C or T, N=A or G or C
or T

OL68-71R (5'-GGG AAC TTC CAG TAC
CAY CC3')

C. 研究結果

- ① 119 検体の食品からエンテロウイルスおよびその他のウイルスは分離されなかった。(表 1)
- ② 食品から直接抽出した RNA を用いた RT-nested PCR においてエンテロウイルス遺伝子は検出されなかった。

D. 考察

海産物からウイルスが分離されず、エンテロウイルス遺伝子も検出されなかった。したがって、試験した輸入食品はエンテロウイルス、アデノウイルス等のウイルスに汚染されていないと考えられた。

本研究で用いた RT-nested PCR の手法は兵庫県の局地でエンテロウイルス 71 の死亡例を含む重症中枢神経感染症の多発時に用いた際にウイルス分離より高率にウイルスを検出しえた方法(論文発表の 2 参照)である。この方法でもエンテロウイルスが検出されなかったことは、ウイルス分離陰性の結果と一致した。同じ RT-nested PCR を流行予測事業のポリオ感染源調査検体に用いたところ、69 名の健康小児のうち 16 名(23%)からエンテロウイルス遺伝子を検

出すことができた。うち1名はシーケンスの結果ポリオウイルス3型と同定され、国立感染症研究所の清水博之博士から分与を受けたRD-A細胞によって分離して、分離株のVP3/VP1領域の制限酵素切断解析の結果、3型のポリオウイルスSabin株と同定されたことと一致した(図1)。

調査した検体からウイルスが分離されなかったことから、輸入海産物のエンテロウイルス、アデノウイルス等の汚染率が低いことが推定された。しかし昨年(1998)の報告で国立感染症研究所の長谷川斐子博士⁴⁾が海産物109検体中1検体(中国産アサリ)でエンテロウイルスを分離している、明らかに汚染された食品が存在している。我々は、ネパールの下痢症患者検体からのウイルス分離でエコーウイルス19型、コクサッキーA21型など日本で流行していないウイルスを分離(未発表データ:本研究の一部として実施中)しているが、この例のように日本で流行していないウイルスが海外では流行している、それが国内に持ち込まれた場合、大規模な流行を引き起こす可能性がある。コクサッキーA21は外国では呼吸器感染症を引き起こす代表的なエンテロウイルスの一つとされている⁵⁾が日本での分離はほとんどない。1985年の調査⁶⁾で0~20歳までのコクサッキーA21に対する中和抗体保有率が0%であったことが報告されている。日本と人的な交流が多くない国(または地域)も日本への輸入食品供給国となりえる。したがって、輸入食品中の感染性ウイルスはたとえ頻度が少なくても、その国内への侵入を軽視することはできないと考えられる。

E. 参考文献

- 1) 篠原美千代、内田和江、島田慎一、後藤敦:コクサッキーA16及びエンテロウイルス71型の検査法の検討、感染症学雑誌、73、749-757, 1999.
- 2) 石古博昭、成沢忠、北村明子 他:PCR増幅DNAのストリンジェント・リバーシ固相ハイブリダイゼーションによるエンテロウイルスの型鑑別、臨床とウイルス、22:199-207,1994.
- 3) Shimizu, H., Utama, A., Yoshii, K., Yoshida, H., Yoneyama, T. et al.: Enterovirus 71 from fatal and nonfatal cases of hand, foot and mouth disease epidemics in Malaysia, Japan and Taiwan in 1997-1998, Jpn. J. Infect. Dis., 52, 12-15, 1999.
- 4) 長谷川斐子: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、厚生科学研究費補助金 生活安全総合事業平成13年度 総括・分担研究報告書、2002:81-83.
- 5) White, D.O., and Fenner, F.J. 1994. *Picornaviridae*, p.381-406 In *Medical Virology*, 4th ed, Academic Press, San Diego.
- 6) 松尾美代子、松永泰子:コクサッキーウイルスA21による呼吸器疾患の流行と一般住民の中和抗体保有率、臨床とウイルス、18、391-396、1990.

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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

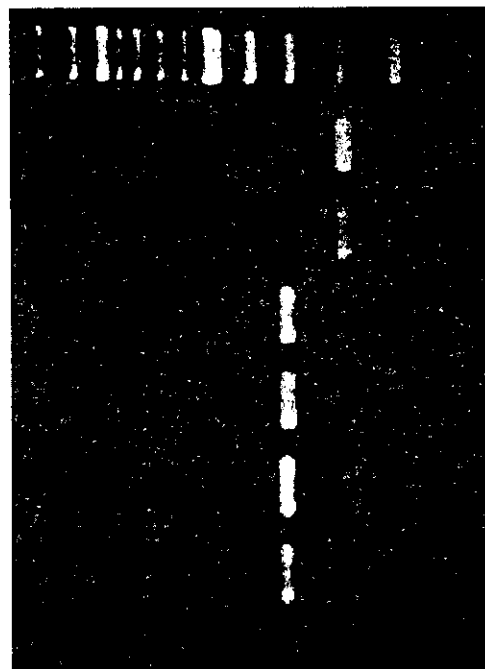
- 本嗣人、近平雅嗣、西尾 治：スイミングスクールを介したと推定されるアデノウイルス 4 型による咽頭結膜熱の流行、臨床とウイルス、30、270-274、2002.
- 2) Fujimoto.T., Chikahira. M., Yoshida, S., Ebira, H., Hasegawa, A. Totsuka, A. and Nishio.O.: Outbreak of Central Nervous System Disease Associated with Hand, Foot, and Mouth Disease in Japan during the Summer of 2000: Detection and Molecular Epidemiology of Enterovirus 71, *Microbiol. Immunol.* 46,621-627, 2002.
- 3) 吉田 茂、藍 祥子、今井恵介、三舛信一郎、筋ひとみ、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.
- 4) 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、174、2002.
- 2002.
- 3) 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、秋田、2002.
- 4) 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、奈良、2002.
- 5) 藤本嗣人、近平雅嗣、増田邦義、西尾治、吉田茂：日本において一般的に軽症と考えられている 手足口病起因ウイルスが、兵庫県内において死亡例と後遺症例を含む、重症中枢神経患者を多発させたケースに関する調査研究、平成 14 年度兵庫県公衆衛生協会総会兼中央研究会、神戸、2002.

2. 学会発表

- 1) 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、札幌、2002.
- 2) 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、秋田、

図1 Polio 3 兵庫県分離株 の PCR-RFLP

Dde I Hae III Hpa II



1 2 3 4 5 6 L

VP3 / VP1 領域

(UG1-UC1)

λ-λ 1, 2 : 313+161bp, λ-λ 3, 4 : 301+166bp、

λ-λ 5, 6 : 194+175+105bp、 L : 100bp DNAラダー

結果は、ワクチン株であるSabin株のものと完全に一致し、兵庫県の分離株はワクチン由来株であることが明らかになった。

厚生労働省のポリオウイルス実験室診断マニュアルによる方法に準じて試験した

表1.輸入食品の組織培養によるウイルス分離・PCR試験 H14年度 兵庫県立健康環境科学研究所

県名	検体採取日	受け取り日	Sample name	DATA	RD	GL37	Hep-2	RT-nested PCR
静岡県	H14.3.29	H14.5.17	02-01	03/29/02:韓国産殻付カキ	-	-	-	-
			02-02	03/29/02:韓国産殻付カキ	-	-	-	-
			02-03	03/29/02:中国産ハマグリ	-	-	-	-
			02-04	03/29/02:韓国産赤貝	-	-	-	-
			02-05	03/29/02:北朝鮮産ハマグリ	-	-	-	-
			02-11	04/26/02:韓国産平貝	-	-	-	-
			02-12	04/26/02:中国産ハマグリ	-	-	-	-
			02-13	04/26/02:中国産赤貝	-	-	-	-
			02-14	04/26/02:中国産大正エビ	-	-	-	-
02-15	04/26/02:韓国産殻付カキ	-	-	-	-			
静岡県	H14.5.30	H14.8.7	02-21	05/30/02:中国産ハマグリ	-	-	-	-
			02-22	05/30/02:中国産赤貝	-	-	-	-
			02-23	05/30/02:韓国産平貝	-	-	-	-
			02-24	05/30/02:韓国産赤貝	-	-	-	-
			02-25	05/30/02:北朝鮮産ハマグリ	-	-	-	-
	H14.6.21	H14.8.7	02-31	06/21/02:中国産ハマグリ	-	-	-	-
			02-32	06/21/02:北朝鮮産赤貝	-	-	-	-
			02-33	06/21/02:北朝鮮産ハマグリ	-	-	-	-
			02-34	06/21/02:中国産赤貝	-	-	-	-
			02-35	06/21/02:韓国産カキ	-	-	-	-
	H14.7.25	H14.8.7	02-41	07/25/02:中国産ハマグリ	-	-	-	-
			02-42	07/25/02:韓国産赤貝	-	-	-	-
			02-43	07/25/02:中国産赤貝	-	-	-	-
			02-44	07/25/02:韓国産赤貝	-	-	-	-
			02-45	07/25/02:中国産ハマグリ	-	-	-	-
静岡県	H14.8.27	H14.8.31	02-51	8/27/02:中国産ハマグリ	-	-	-	-
			02-52	8/27/02:中国産赤貝	-	-	-	-
			02-53	8/27/02:韓国産赤貝	-	-	-	-
			02-54	8/27/02:中国産赤貝	-	-	-	-
			02-55	8/27/02:中国産ハマグリ	-	-	-	-
静岡県	H14.10.22	H14.10.29	02-60	10/22/02:中国産車エビ	-	-	-	-
			02-61	10/22/02:北朝鮮産ハマグリ	-	-	-	-
			02-62	10/22/02:中国産赤貝	-	-	-	-
			02-63	10/22/02:中国産赤貝	-	-	-	-
			02-64	10/30/01:韓国産平貝	-	-	-	-
静岡県	H14.11.13	H14.11.19	02-71	11/13/02:韓国産ハマグリ	-	-	-	-
			02-72	11/13/02:中国産赤貝	-	-	-	-
			02-73	11/13/02:韓国産平貝	-	-	-	-
			02-74	11/13/02:韓国産ハマグリ	-	-	-	-
			02-75	11/13/02:中国産赤貝	-	-	-	-

愛媛県	2002/4/8	2002/7/9	E02-01	04/08/03：韓 国産赤貝	-	-	-	-
"	"	"	E02-02	04/08/03：韓 国産赤貝	-	-	-	-
"	"	"	E02-03	04/08/03：中 国産あさり	-	-	-	-
"	"	"	E02-04-1	04/08/03：韓 国産とり貝	-	-	-	-
"	"	"	E02-04-2	04/08/03：韓 国産とり貝	-	-	-	-
"	"	"	E02-05	04/08/03：韓 国産しじみ	-	-	-	-
"	2002/4/25	2002/7/9	E02-06	04/25/03：中 国産ハマグリ	-	-	-	-
"	"	"	E02-07	04/25/03：中 国産あさり	-	-	-	-
"	"	"	E02-07-2	04/25/03：中 国産あさり	-	-	-	-
"	"	"	E02-08	04/25/03：中 国産あさり	-	-	-	-
"	"	"	E02-09	04/25/03：韓 国産赤貝	-	-	-	-
"	2002/5/3	"	E02-10	05/03/03：中 国産ハマグリ	-	-	-	-
"	"	"	E02-11	05/03/03：中 国産ハマグリ	-	-	-	-
"	"	"	E02-12	05/03/02：韓 国産赤貝	-	-	-	-
"	2002/5/23	"	E02-13	05/23/02：中 国産ハマグリ	-	-	-	-
"	2002/5/23	"	E02-14	05/23/02：中 国産あさり	-	-	-	-
"	2002/6/5	"	E02-15	06/05/02：韓 国産赤貝	-	-	-	-
"	2002/6/5	"	E02-16	06/05/02：中 国産ハマグリ	-	-	-	-
"	2002/6/5	"	E02-17	06/05/02：韓 国産赤貝	-	-	-	-
愛媛県	H14.06.27	H14.7.23	E02-18-1	06/27/02：韓 国産赤貝	-	-	-	-
"	"	"	E02-18-2	06/27/02：韓 国産赤貝	-	-	-	-
"	"	"	E02-19-1	06/27/02：中 国産ハマグリ	-	-	-	-
"	"	"	E02-19-2	06/27/02：中 国産ハマグリ	-	-	-	-
"	"	"	E02-20-1	06/27/02：中 国産平貝	-	-	-	-
"	"	"	E02-20-2	06/27/02：中 国産平貝	-	-	-	-
"	"	"	E02-21-1	06/27/02：韓 国産赤貝	-	-	-	-
"	"	"	E02-21-2	06/27/02：韓 国産赤貝	-	-	-	-
"	H14.7.11	"	E02-22-1	07/11/02：中 国産ハマグリ	-	-	-	-
"	"	"	E02-22-2	07/11/02：中 国産ハマグリ	-	-	-	-

"	"	"	E02-23-1	10/12/01: 国産赤貝	-	-	-	-
"	"	"	E02-23-2	10/12/01: 国産赤貝	-	-	-	-
愛媛県	H14.8.12	H14.8.27	E02-24-1	8/12/02: 国産赤貝	-	-	-	-
"	"	"	E02-24-2	8/12/02: 国産赤貝	-	-	-	-
"	"	"	E02-25-1	8/12/02: 中国産あさり	-	-	-	-
"	"	"	E02-25-2	8/12/02: 中国産あさり	-	-	-	-
"	"	"	E02-26-1	8/12/02: 国産赤貝	-	-	-	-
"	"	"	E02-26-2	8/12/02: 国産赤貝	-	-	-	-
"	"	"	E02-30-2	9/4/02: 国産赤貝	-	-	-	-
"	"	"	E02-31-1	9/4/02: 国産あげまき貝	-	-	-	-
"	"	"	E02-31-2	9/4/02: 国産あげまき貝	-	-	-	-
"	"	"	E02-32-1	9/4/02: 中国産ハマグリ	-	-	-	-
"	"	"	E02-32-2	9/4/02: 中国産ハマグリ	-	-	-	-
"	"	"	E02-33-1	9/4/02: 中国産あさり	-	-	-	-
"	"	"	E02-33-2	9/4/02: 中国産あさり	-	-	-	-
"	"	"	E02-34-1	9/4/02: 中国産平貝	-	-	-	-
"	"	"	E02-34-2	9/4/02: 中国産平貝	-	-	-	-
"	"	"	E02-24-2	8/12/02: 国産赤貝	-	-	-	-
"	"	"	E02-25-1	8/12/02: 中国産あさり	-	-	-	-
"	"	"	E02-25-2	8/12/02: 中国産あさり	-	-	-	-
"	"	"	E02-26-1	8/12/02: 国産赤貝	-	-	-	-
"	"	"	E02-26-2	8/12/02: 国産赤貝	-	-	-	-
"	H14.8.26	"	E02-27-1	8/22/02: 中国産ハマグリ	-	-	-	-
"	"	"	E02-27-2	8/22/02: 中国産ハマグリ	-	-	-	-
"	"	"	E02-28-1	8/22/02: 中国産あさり	-	-	-	-
"	"	"	E02-28-2	8/22/02: 中国産あさり	-	-	-	-
"	"	"	E02-29-1	8/22/02: 中国産ハマグリ	-	-	-	-
"	"	"	E02-29-2	8/22/02: 中国産ハマグリ	-	-	-	-
愛媛県	H14.9.4	H14.9.12	E02-30-1	9/4/02: 国産赤貝	-	-	-	-
"	"	"	E02-30-2	9/4/02: 国産赤貝	-	-	-	-
"	"	"	E02-31-1	9/4/02: 国産あげまき貝	-	-	-	-
"	"	"	E02-31-2	9/4/02: 国産あげまき貝	-	-	-	-
"	"	"	E02-32-1	9/4/02: 中国産ハマグリ	-	-	-	-
"	"	"	E02-32-2	9/4/02: 中国産ハマグリ	-	-	-	-
"	"	"	E02-33-1	9/4/02: 中国産あさり	-	-	-	-
"	"	"	E02-33-2	9/4/02: 中国産あさり	-	-	-	-
"	"	"	E02-34-1	9/4/02: 中国産平貝	-	-	-	-
"	"	"	E02-34-2	9/4/02: 中国産平貝	-	-	-	-
愛媛県	H14.10.2	H14.10.22	E02-35-1	10/02/02: 国産赤貝	-	-	-	-
"	"	"	E02-35-2	10/02/02: 国産赤貝	-	-	-	-
"	"	"	E02-40-1	10/11/02: 中国産ハマグリ	-	-	-	-
"	"	"	E02-40-2	10/11/02: 中国産ハマグリ	-	-	-	-