

**厚生労働科学研究費補助金**

**食品安全確保研究事業**

**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 15 年度 総括・分担研究報告書**

**平成 13～15 年度 総合研究報告書**

**主任研究者 西尾 治 (国立感染症研究所)**

**平成 16 年 3 月**

## 目 次

### I 総括研究報告

平成 15 年度総括研究報告書

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 西尾 治	-----	1
-------------------------------------	-------	---

### II 総合研究報告

平成 13～15 年度総合研究報告書

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 西尾 治	-----	23
-------------------------------------	-------	----

### III 分担研究報告

1. 市販カキにおけるノロウイルス及び A 型肝炎ウイルス汚染 状況の把握と安全評価に関する研究 野田 衛・西尾 治	-----	73
2. 市販生カキのノロウイルス汚染について 西田 知子・西尾 治	-----	86
3. 養殖カキのノロウイルス汚染状況 植木 洋・西尾 治	-----	93
4. カキ養殖海域におけるノロウイルスの定量的把握と検出株の 遺伝子学的解析並びに集団発生事例から検出したノロウイル スの遺伝子学的解析 福田 伸治・西尾 治	-----	100
5. 海水とカキにおけるノロウイルス汚染状況に関する研究 吉澄 志摩・西尾 治	-----	110
6. ノロウイルスの下水処理施設における挙動および養殖カキ への汚染経路の把握 植木 洋・西尾 治	-----	118
7. 平成 15 年度のウイルス性食中毒様集団発生事例について 杉枝 正明・西尾 治	-----	125

8. ふん便および吐物中に含まれるノロウイルス量について 大瀬戸 光明・西尾 治	-----	134
9. 平成 15 年度に検出されたノロウイルスの遺伝子型 西尾 治	-----	141
10. ノロウイルス検査法の評価及び食品のノロウイルス汚染 状況調査 篠原 美千代・西尾 治	-----	147
11. 内陸部におけるカキ及び食中毒患者から検出された ノロウイルスの疫学的研究 木村 博一	-----	155
12. 三重県の養殖カキにおける Norovirus 汚染状況調査 荒川（西）香南子	-----	160
13. 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 新川 奈緒美	-----	186
14. 輸入食品のウイルス汚染状況調査・研究 古屋 由美子	-----	194
15. 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 大瀬戸 光明	-----	207
16. 輸入食品のウイルス汚染状況調査・研究 杉枝 正明	-----	213
17. 輸入食品のウイルス汚染状況調査・研究 宇宿 秀三	-----	220
18. 検出法の評価、食品のウイルス汚染状況調査・研究 春木 孝祐	-----	226
19. ノロウイルス検査における RNA 抽出コントロール としてのエコーウイルス 9 型 Hill 株の適用について 藤本 嗣人	-----	237

20. 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 藤本 嗣人	-----	245
21. 日本とベトナムの小児における Norovirus 感染に関する研究 下痢症ウイルスの迅速診断法の開発 — Multiplex-PCR 法 — 牛島 廣治	-----	249
22. 地理情報システム(Geographic Information System, GIS) を 利用し食品汚染と危機管理対応の検討 鈴木 宏	-----	254
23. 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 伊藤 健一郎	-----	261
<b>IV 研究成果の刊行物・別冊</b>	-----	271
<b>V 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		
<b>VI データ</b>		
1. 市販カキ検査結果		
2. 臨床材料検査結果		
3. 輸入食品検査結果		
4. ノロウイルスによる食中毒事例検査結果		

# I

厚生労働科学研究費補助金

(食品安全確保研究事業)

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 15 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)

平成 15 年度厚生労働科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）  
総括研究報告書

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、14 年に厚生労働省に届けられた食中毒のうちノロ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 1/3～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。A 型肝炎ウイルス感染患者には食品を介して起きているが相当数存在すると予測され、実際に集団発生が起きている。

本研究は食品の微生物学的安全性の確保により国民の健康維持・増進を目的として遂行した。

食品中に含まれるウイルス量が少ないので、感度の良い検査法の改良・開発を行ったところ、細胞破碎法と超遠心法を比較した結果、破碎法は短時間に多検体の処理が可能であり、カキからのノロウイルス濃縮法として有用と考えられた。

下痢症を引き起こすウイルスであるノロウイルスの Genogroup I (GI) と Genogroup II (GII)、Sapovirus、Astrovirus の 4 種のウイルスが同時に検出できることを証明した。

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 10 コピー以上を示したものは陽性と判断して良いと考えられた。10 コピー以下のものについては陽性も相当数含まれるが、必ずしも陽性ではなく、今後この値に対する検討が不可欠である。

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 型および E 型肝炎ウイルス汚染を定量的に調査・研究を行ったところ、国内産生食用生カキでは 10%、加熱用カキでは 6%からノロウイルスが検出された。生食用生カキ 1 件から極めて微量の A 型肝炎ウイルスが検出された。なお、直ちに同一海域の多数のカキについて検査を行ったが全て陰性であった。

例年では、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た。しかし今年度は 10 月から陽性が見られ、2 月まで陽性のカキが認められたが、カキ事例による食中毒事例は非常に少数であった。

下水処理場の流入、放出水、河川水、海水およびカキの関連性では、下水処理場の流入水には 10 月に既に見られたことから、年間を通してノロウイルスが流入していると考えられた。下水処理施設に流入したノロウイルスは 1/100～1/10,000 以下に除去され

る。しかし、処理施設での処理能力を超えたウイルス量が流入すると下水処理施設の放流水からウイルスが検出され、河川水、海水からもウイルスが認められ、カキがノロウイルスに汚染される。この閉鎖系の湾内では11月から2月に乳幼児に急性胃腸炎を起こしたノロウイルスが、処理場、河川、海水そしてカキを汚染している。処理場の能力を高めることおよび放流水中のウイルス量の監視はカキの安全性の確保に重要であると言える。

また、E海域では海水温が10℃以下、降水量が50mmを超えた後カキがノロウイルスに汚染されるので、この2点を基準にすることにより、カキの安全性がある程度確保されることが考えられた。

カキ養殖筏におけるカキの汚染は部位により様々であり、垂直調査で海面の上層および中層(海面7m)は比較的陽性が多いものの、一定の傾向は未だ見出されていない。

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取扱者を介して食品に付着し発生するものとが認められた。カキ事例は飲食店・旅館で、20人以下の規模で発生し、複数の患者から検出される遺伝子型は多様であった。食品取扱者事例は飲食店・旅館のみならず施設(保育園、老人ホーム等)、学校等でしばしば100人以上の大規模な集団発生を起こし、複数の患者から検出される遺伝子型は同一であった。

食中毒原因食材と推定された同一パックあるいは海域のカキでは3事例のうち2事例でRT-PCR法でノロウイルスが検出されたが、リアルタイムPCRは行えなかった。原因食材の確保がリスク評価に極めて重要であるが、確保が難しいのが現状である。

主に東南アジアからの輸入魚介類におけるノロウイルス汚染は26%に見られ、例年よりもかなり高率であった。A型肝炎ウイルス、E型肝炎ウイルス、野性ポリオウイルスは全て陰性であった。日本で見られていない遺伝子型が海外からの生鮮魚介類とともに侵入してきている。これらの新しい遺伝子型の消長を追跡しなければならないと考えている。

集団急性胃腸炎事例と小児の散发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。定点当たりの患者数が5以上になると集団発生が起きる危険性が高いことが明らかとなった。

分子疫学的解析からカキの汚染と乳幼児における下痢症の遺伝子型との関連性が認められた。カキ事例の患者からは例数が少ないこともあり、関連性があまり見られなかった。しかし、市販カキとカキ事例の食中毒の両方でよく検出されるものと、片方のみ見られたものが存在した。

各地の小児感染性胃腸炎患者と病院、保育所、学校、養護施設、介護老人施設等における感染性胃腸炎集団事例の患者のふん便からノロウイルスのGⅡに属するMaryland 6タイプ類似株が検出され、新しい病原性の強い株であるか否かのウイルス学的検討を行っている。

下痢性大腸菌における生物活性の測定法として、簡便なコンタクトヘモリシス法を検討したところ *eae* 型によって異なる条件を使う必要があり、標準的な FAS 試験の改良法を開発した。また、EspB の分泌は生物活性とよく相関し、イムノクロマト法等の利用が可能と思われた。

局在性付着大腸菌では、同じ *eae* 遺伝子型に含まれる 055:H7 と 0157:H7 の *espA* 遺伝子は、0157:H7 の配列から設計したプライマーで検出された。(2)EPEC の病原性試験としてアクチンの蓄積を FITC-ファロイジンで、菌を DAPI で染色することで判定が容易となった。H 抗原検査は PCR による検査法で EPEC カテゴリーを多く含む H2、H6、H8 及び H11、H21 を 2 回の Multiplex PCR で検出することが可能となった。

食品の汚染状況調査の対象に漬物以外に茹で麺、生カキを加え、セレウス菌が漬物で 8 件 (21.6%)、茹で麺 6 件 (31.6) から分離された。また、下痢原性大腸菌分離を目的に、生カキ 19 検体 (52.8%) が下痢原性大腸菌分離陽性で、3 検体が基準をオーバーしていた。その血清型は 0153 (3 株)、08 (2 株)、0126 (1 株) であった。

#### 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衛生研究課 課長

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

春木孝祐 大阪市立環境科学研究所保健疫学課長

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

新川奈緒美 鹿児島県環境保健センター主任研究員

木村博一 群馬県立衛生環境研究所

#### 研究協力者

沖津祥子、顔海稔、大亀路生 東京大学

林志直 東京都健康安全研究センター  
原みゆき、片山丘 神奈川県衛生研究所

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ー

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

吉澄志磨 北海道立衛生研究所

三上稔之、石川和子、小笠原和彦 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

植木洋、山木紀彦、渡邊節、沖村容子、

秋山和夫 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

斉藤美香、長井章、森田幸雄、石岡大

成、小澤郁壽 群馬県衛生環境研究所



篠原美千代、瀬川由香里、内田和江、  
島田慎一、土井りえ 埼玉県衛生研究所  
近平雅嗣 兵庫県立健康環境科学研  
究センター

入谷展弘 大阪市立環境科学研究所  
勢戸祥介 大阪市立大学大学院  
近藤玲子、山下育孝、吉田紀美、豊嶋  
千俊 愛媛県立衛生環境研究所  
田中俊光 千葉市保健所

田村努、西川眞、 新潟県保健環境科  
学研究所

秋山美穂、愛木智香子、阿部陽子、齋  
藤利江、長谷川斐子、岡部信彦 国立感  
染症研究所

#### 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14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ノロ  
ウイルスによる患者数が第1位で、事例  
の1/3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。近年はE型肝炎  
ウイルスも社会的な問題ともなっている。  
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、食の  
安全が良く要求されている。食品の微生  
物学的な安全性の確保も当然ながら強く  
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。

検査法は極めて重要であることから、  
検査法の改良、検討を行った。

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。過去2年間  
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、東南アジアが  
依然として濃厚汚染地域である。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、西アジア、アフリカ地  
域等では依然として残存しているため、  
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  
ター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に続き、浄化処理施設への流入水および放流水、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て、生食カキ養殖海域の上層、中層、下層での汚染状況を調査・研究した。更に、プランクトンにおけるノロウイルス汚染も調査した。

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、分子疫学的解析も加えた。

近年、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ている。そこで本研究班においても、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および鹿等の野生動物ならびにブタの肝臓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パックのものについてウイルス定量と遺伝子型を調べ、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。この要因を解明するため、患者あるいは食品取扱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。

大腸菌における生物活性の測定法として、標準的なFAS試験を検討した。

局在性付着大腸菌の病原性試験として標準的なFAS法は判定が困難であるが、アクチンの蓄積をFITC-ファロイジンで、菌をDAPIで染色することで判定が容易となった。

PCRによる検査法を検討した。EPECカテゴリーを多く含むH2、H6、H8及びH11、H21を2回のMultiplex PCRで検出することが可能となった。

食品の汚染状況調査のセレウス菌分離では、浅漬け、麺類を調査し、陽性がそれぞれ8件(22%)と6件(32%)で、分離されたセレウス菌のほとんどはエンテロトキシンが陽性であった。下痢原性大腸菌分離を目的に、生カキ36検体を調査したところの0153(3株)、08(2株)、0126(1株)が分離された。0153が分離された生カキの加工場の周辺海域の環境調査を実施したところ、海水から0153を分離した。このことからカキについて細菌の検査も必要であると考えられた。

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

カキからのノロウイルス抽出法として細胞破碎法と超遠心法を比較した。

下痢症を引き起こすウイルスであるノロウイルスの Genogroup I と Genogroup II (GI, GII)、Sapovirus、Astrovirus の 4 種のウイルスが同時に検出できる Multiplex-PCR 法を検討した。ノロウイルス検査の RNA 抽出時のポジティブコントロールとしポリオウイルス 2 型 Sabin 株 (P2) がこの目的のために用いられてきた。しかし、ポリオ撲滅プログラムの進展とともに、実験室の P2 の使用が難しくなりつつある。ポリオウイルスに代わるものとして、エコーウイルス 9 型 Hill 株 (E9 Hill) について検討した。

市販されている生カキ及び食中毒に関連した生カキについてノロウイルスの検出におけるリアルタイム PCR を用いた検査において、実測値 10 コピー未満の結果をどのように評価し、カキのノロウイルス検査結果とするかを検討した。リアルタイム PCR の定量限界値 (10 コピー cDNA/tube) 以下の検体について、COG-F/SKR プライマーを用いた 1st PCR で得られた産物を用いてリアルタイム PCR を行う方法 (以下 2nd リアルタイム) と SKF/SKR プライマーを用いた従来の PCR (以下 2nd PCR) の 2 方法を実施した。リアルタイム PCR、2nd リアルタイム、2nd PCR の 3 方法の結果について検討を加えた。

## 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

### 1) 国産カキ

国産生食用カキは 323 パック、加熱用カキ 34 パック、1 パックにつきカキ 3 個を検査に用いた。

食中毒事例原因カキ 3 事例からの同一

パックのカキについて、ノロウイルスの定量を行った。

### 2) 輸入生鮮魚介類

輸入魚介類は 246 件について行ったが、主な輸入国は中国 159 件、韓国 57 件、北朝鮮 20 件で、主な貝種はアカガイ 107 件、ハマグリ 101 件で、その他にタイラギ、ブラックタイガー、カキ等であった。

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。また一部については E 型肝炎ウイルスの検査も行った。

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。

## 3. 環境中のウイルス汚染実態

養殖海域に流入している下水処理場の流入および放出水、河川水 6 地点、カキ養殖 7 海域の 11 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 126 事例を調査した。カキ関連食中毒 22 事例からの患者ふん便 137 件、食品取扱者ふん便 51 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 12 事例について遺伝子配列を決定した。

原因食材が食品取扱者による食中毒 104 事例の患者ふん便 685 件、食品取扱者ふん便 516 件、吐物 13 件、食品 197 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 36 事例について遺伝子配列を決定した。

#### 5. 分子疫学的解析

分子疫学的解析はカキからのノロウイルス 62 件、乳幼児下痢症患者のふん便からの 64 件、食中毒カキ事例の患者ふん便 12 事例、食品取扱者ふん便 1 事例、食品 1 事例、食品取扱者事例の患者ふん便 35 事例、患者吐物 3 事例、食品取扱者ふん便 9 事例について、カプシド領域について検討した。

#### 6. 地理的・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

地域での感染性胃腸炎の患者発生動向調査における定点当たりの患者数と集団発生との関連性の有無について検討した。また、乳幼児、集団発生事例についてノロウイルスの分子疫学的調査を行い関連性について追及した。

#### 7. 下痢原性大腸菌の食品汚染と遺伝子診断法の確立

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付着性大腸菌の病原性検査法の確立と、食品の汚染状況を把握することを目的とした。

##### 1) 遺伝子診断法の開発

付着性大腸菌（局在性・凝集性・拡散性）のスクリーニング及び確認用の Multiplex PCR を開発した。H 抗原（H2、H6、H11、H21、H8）の PCR による検査法を検討した。

##### 2) 病原性診断法の開発

生物活性の測定法として、簡便なコンタクトヘモリシス法を検討した。*eae* 型によって異なる条件を使う必要がある。標準的な FAS 試験の改良を行った。また、EspB の分泌は生物活性とよく相関し、イムノクロマト法等の利用が可能と思われた。

局在性付着大腸菌では、(1) 同じ *eae* 遺伝子型 ( $\gamma$ ) に含まれる 055:H7 と 0157:H7 の *espA* 遺伝子は、0157:H7 の配列から設計したプライマーで検出された。データベースでは配列はかなり異なっているが、少なくとも日本の分離株はよく似た型と推測される。(2) EPEC の病原性試験として標準的な FAS 法は判定が困難であるが、アクチンの蓄積を FITC-ファロイジンで、菌を DAPI で染色することで判定が容易となった。(3) H 抗原検査は何度も運動性強化を行う必要があり、時間と手間がかかる。PCR による検査法を検討した。EPEC カテゴリーを多く含む H2、H6、H8 及び H11、H21 を 2 回の Multiplex PCR で検出することが可能となった。

食品の汚染状況調査の対象に漬物以外に茹で麺、生カキ 36 件を加えた。セレウ

ス菌および大腸菌の分離を目的に調査した。

## C. 研究結果および考察

### 1. 検査法の確立

細胞破碎法と超遠心法を比較した結果、1月26日に採取したカキを除き5個体の平均定量値は細胞破碎法が高かった。破碎法は超遠心法と比較し、短時間に多検体の処理が可能であり、カキからのノロウイルス濃縮法として有用と考えられた。

下痢症を引き起こすウイルスであるノロウイルスの Genogroup I と Genogroup II (GI, G II)、Sapovirus、Astrovirus の4種のウイルスが同時に検出できることを証明した。これにより、4種のウイルス検出を1本のチューブで行え、検査の省力化・経費の軽減が可能となった。

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。このことから、実測値 10 コピー以上を示したものは陽性と判断して良いと考えられた。10 コピー以下のものについては陽性も相当数含まれ、必ずしも陰性ではなく、今後この値に対する検討が不可欠である。

### 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

#### 1) 国産カキ

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 で最も大きい値をそのパックの汚染量とした。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 当りに換算すると 125 コピーとなる。エビ類は腸管 200g を採取し検査した。

国産食用カキは 323 パック中 31 パック (10%) から、ノロウイルスが検出された。月別では、10 月、11 月は過去 2 年間はノロウイルスに汚染されたカキは見られなかったが、本年度は 10 月が 11%、11 月が 19% と高く、12 月から 2 月は 7 から 11% の汚染率であった。1 個当りの汚染量では  $\geq 125 \sim < 300$  コピーが 14 パック、 $\geq 300 \sim < 500$  は 4 パック、 $\geq 500 \sim < 1000$  は 5 パック、 $\geq 1000$  は 8 パックに見られた。

また、 $> 0 \sim < 60$  は 83 パック、 $\geq 60 \sim < 125$  コピーは 13 パックであった。このことから、カキ汚染が例年よりも 2 ヶ月早く見られたものの、3 月までの汚染率は 10% で昨年よりも若干高い汚染率であった。乳幼児におけるノロウイルス汚染は例年に比べ 1 ヶ月程度遅れ 12 月から多発したのに対し、10 月、11 月にノロウイルス陽性カキは西日本の 3 海域で養殖されていたものであったが、その汚染源については明らかにすることができなかった。

カキの検査個数について検討したところ、125 コピー以上を陽性とした場合、カキ 1 パック 3 個を検査したもののうち、陽性パック中、3 検体全てが陽性というものはなかった。また、検体ごとに定量値のレベルも異なっていた。2 パックについて 10 個、1 パックについて 30 個のカキを検査したところ、2 パックに 125 コピー以上のノロウイルスを保有してい

るカキが1/10個の割合でみられた。このことから、検査個数について緊急に検討する必要がある。

リアルタイムPCRを用いて市販されている生カキ及び食中毒関連の生カキの検査を実施したところ、ほとんどのカキは実測値10コピー以下で、定量限界値(10コピーcDNA/tube)以下であり、数値の再現性が必ずしも確保できなかった。しかし、10コピー以下は定量限界値以下であっても、陽性である可能性は高く、陰性として扱うことも適当とは思われない。リアルタイムPCRの結果が $>0 \sim <10$ コピーの取り扱いをさらに検討が必要である。パックを構成するカキ1個ずつについて個別に判定をするのではなく、パック単位で判定をする方が、より現実的と考えられる。

2004年1月13日加工の国内産食用カキからA型肝炎ウイルスがRT-PCR法で検出された。しかしリアルタイムPCRによる定量では陰性であった。2週間後以内の同一海域のカキを12ロット、3個づつを5ロット検査し、以前のロットについても調査したが、遺伝子検出、定量ともに陰性であった。このことから一時的に微量のA型肝炎ウイルスの汚染があったものと判断された。検出されたA型肝炎ウイルスの遺伝子型は1A型で東南アジアに広く分布しているものであった。

加熱用カキ34パックのうちノロウイルスが125コピー以上示したものは2パック(6%)のみであった。昨年度は加熱用カキで125コピー以上に汚染されていたものは46%に認められたが、今年度は非常に低率であった。陽性は11月の検体からで、12~2月はすべて陰性であった。

## 2) 輸入生鮮魚介類

輸入生鮮魚介類は246件についてノロウイルスおよびA型肝炎ウイルスについてリアルタイムPCR法で汚染量を測定したところ、ノロウイルスは63件(26%)から検出された。主な魚介類のノロウイルス汚染はアカガイが107件中34件(32%)、ハマグリが101件中19件(19%)であった。国別では中国産が159件中38件(24%)、韓国産57件中18件(32%)および北朝鮮産20件中5件から検出された。

月別では年間を通して、ノロウイルスは検出され、4,5,8,10月の検出率が高く、季節的要因は見られなかった。輸入魚介類から検出されたノロウイルスの遺伝子型はC-9,10,23,36で、このうちのC-23,36は国内では見られていない。このことから、わが国に生鮮魚介類を介してノロウイルスが侵入しているのみならず、日本に存在しない新たな遺伝子型も入り込んでいる。今後新たに侵入してきた遺伝子型の推移、消長を継続して監視する必要があるものと考えている。

## 3. 環境中のウイルス汚染実態

海域定点Aの海水からは2~3月にかけてノロウイルスが検出されたが、ウイルス量は5.72及び1.55コピー/l(全て実測値10コピー以下)と、平成14年度の同時期より4~17倍低かった。平成15年度は海面が結氷しなかったことから、海域定点Aの海水の拡散が例年より進み、ノロウイルスの濃度の上昇が抑えられた可能性が考えられた。下水中の1月以降の優勢株であったC-27のノロウイルスが検出され、下水の流入と海水汚染の関連が認められた。この地域の5処理施設ではノロウイルスが1/100から

1/100,000 に除去される。下水処理施設に流入するウイルス量が極めて多くなると処理施設で除去できなく、下水放流水からウイルスが検出される。その結果、カキ及び海水からノロウイルスが認められるようになる。この地域でカキ汚染を起こした下水処理施設は他の施設に比べノロウイルス除去率が最も低い処理場であり、閉鎖海域では処理施設のウイルス除去能力および放流水についての対策が必要であると考えられた。

B 海域におけるノロウイルスの分布の定量的把握を行った。海水およびカキとも加熱調理用カキ出荷海域では海水で最高  $8 \times 10^2$  コピー/ℓ、カキ  $19 \times 10^2$  コピー/個を示したが、生食用カキ出荷海域では、海水で  $3.0 \times 10^1$ /ℓ を 1 回、カキで  $1.3 \times 10^2$  コピー/個から  $4.8 \times 10^2$  コピー/個を 4 回計測したのみで、その他の実測値 ( $4 \mu\text{l}$ ) は 10 コピー以下であった。沿岸部に近いほど河川水による汚染の影響を強く受ける傾向にあった。また、実測値は小さいものの 1 月および 2 月に多く検出される傾向にあった。カキ養殖筏の部位別水深別では、部位によらず上 (海面下 0.5m) および中 (海面 4.5m) での検出率が高い傾向にあり、中層付近まで河川水による汚染の影響を受けていることが示唆された。

2003/04 年シーズン (11 月から 2 月) に、C 海域の延べ 4 地点 (1 地点は加熱調理用カキ出荷海域) の海水およびカキについてノロウイルス汚染の定量的把握を行った。海水およびカキとも加熱調理用カキ出荷海域において、リアルタイムの実測値 ( $4 \mu\text{l}$ ) は 10 コピー以下か陰性で、今年度はカキのノロウイルス汚染が少なかった。

乳幼児の下痢症患者、海水およびカキから検出されたノロウイルスは、C-4 (Southampton 類似株) が高率に検出されたことから、養殖カキへのノロウイルスの汚染経路は、胃腸炎患者～下水処理場～河川水～カキの経路が示された。

D 海域において流入水と放流水中に含まれるノロウイルス遺伝子を定量し、下水処理場でのノロウイルスの除去効果を調査した結果、1.2log から 2.6log の除去が確認されが、A 地区よりも除去能力は低かった。

カキは好条件であれば 1 時間に約 180 の海水を濾過し、海水中のプランクトン等の餌を取り込んでいる。E 海域のカキでノロウイルスが検出され始めるのは海水温が  $10^\circ\text{C}$  以下になる頃であり、海水温の低下により消化活性が低下し、カキ体内に取り込まれたノロウイルスが残存しやすくなっていることが考えられる。もう一点は E 海域で 50mm 以上の降雨後カキの汚染が見られることであったが、03 年は 12 月～2 月の間では 50mm 以上の降雨はなく、この点に関しての研究は行えなかった。

また、同一筏から 5 個のカキを採取して、個々についてノロウイルス汚染状況を調査したところ、個体毎に汚染量は多様であったが、降雨が少なかったこともあって、汚染は例年に比べ少なかった。

#### 4. 食品媒介集団発生状況

カキ関連食中毒 22 件で、主な発生月は 12 月が 9 事例、1 月が 6 事例、2、3 月が各 2 事例で、例年に比べ非常に少なかった。

発生施設は殆どが飲食店・旅館が 90% を占めた。喫食者患者 608 人中 259 人

(43%)発症した。患者ふん便 137 件中 90 件(66%)、食品取扱者ふん便 51 件中 5 件 (10%) から検出された。このことは食品取扱者が原因食材を喫食した結果であると推察される。従って、食品取扱者はノロウイルス汚染の危険性のあるカキを生食しないようにすることも予防に重要である。食品 197 件中 3 件がノロウイルス陽性であった。原因食材は 3 事例から得られ、2 事例は RT-PCR で陽性であったが、リアルタイム PCR は行えなかった。他の 1 例からのカキは RT-PCR、リアルタイム PCR 共に陰性であった。

食品取扱者事例は 104 件で、主な発生日は 11 月が 12 事例、12 月が 29 事例で最も多く、次いで 1 月の 28 事例であった。

発症施設は殆どが飲食店・旅館が 50% で、事業所、学校での発生が多く見られている。またカキ事例では事例当たりの患者数が 20 人以下が殆どであったのに対し、食品取扱者事例は 20 人以上が多く、しばしば 100 人以上の大規模な発生が見られた。原因食材の喫食者は 8940 名中発病者が 2665 名(30%)であった。患者ふん便 685 件中 497 件 (73%)、食品取扱者ふん便 516 件中 83 (16%)、吐物 13 件中 9 件(69%)から検出された。

カキ事例と食品取扱者事例では発生原因、発生様式等に違いがあり、それぞれに分けて対策を行う必要がある。

## 5. 分子疫学学的解析

分子疫学学的解析は市販カキから 62 件、乳幼児 64 件、カキ事例の患者ふん便 12 事例、食品取扱者ふん便 1 事例、食品 1 事例、食品取扱者事例の患者ふん便 35 事例、患者吐物 3 事例、食品取扱者ふん便 9 事例について行ったところ、カキ

からは、GI が 7 遺伝子型 (C-1, 2, 3, 6, 22, 30, 33)、GII では 4 遺伝子型 (C-10, 15, 16, 20)、GI と GII の混在が 3 種類 (C-1・10, C-6・15, C-30・10) 見出されており、GI では C-30 が 9 件、GII では C-15 が 14 件、C-10 が 10 件と多かった。乳幼児下痢症患者のふん便からは、GII が 8 遺伝子型 (C-9, 10, 13, 14, 15, 16, 18, 20) 見出され、C-10 が 18 事例と最も多く、次いで多く検出された型は、C-20 が 15 事例、C-9 が 14 事例であった。カキ事例の患者ふん便 12 事例からは、GI が 1 遺伝子型 (C-6)、GII が 2 遺伝子型 (C-9, 20)、GI 遺伝子型の複数検出が 1 種類 (C-5・30)、GII 遺伝子型の複数検出が 2 種類 (C-9・10, C-9・16)、GI と GII の混在が 3 種類 (C-6・9, C-30・33・10, C-4・6・10・13・16) 見出され C-9 が多かった。食品取扱者ふん便 1 事例は GI と GII の混在 (C-30・18) で、食品 1 事例は GI と GII の混在 (C-4・28) であった。食品取扱者事例の患者ふん便からは GI が 2 遺伝子型 (C-6, 30)、GII が 4 遺伝子型 (C-9, 10, 14, 16)、GI 遺伝子型の複数検出が 2 種類 (C-1・22, C-6・30)、GII 遺伝子型の複数検出が 2 種類 (C-9・10, C-9・15)、GI と GII の混在が 4 種類 (C-5・16, C-30・18, C-6・10・13, C-30・10・20) 見出され、C-9、C-10、C-6 の順に多く検出された。食品取扱者ふん便 9 事例からは、GI が 1 遺伝子型 (C-6)、GII が 2 遺伝子型 (C-9, 20) 見出され、C-6 と C-9 が 4 事例、C-20 が 1 事例から検出された。吐物 3 事例からは、GI が 1 遺伝子型 (C-6)、GII が 1 遺伝子型 (C-9) 見出された。C-10, C20 遺伝子型は市販カキ、カキ事例、食品取扱者事例および乳幼児下痢症から全て検出されており、乳幼児→環境汚染



からカキ→カキ事例あるいは乳幼児→食品取扱者→食品取扱者事例の経路が分子疫学的に明らかとされた。C-9 は、カキ事例、食品取扱者および乳幼児下痢症患者から見られ、上記 2 遺伝子型と同様な動向を示したものと推察され、同様な傾向は C-6, C-30 でも見られている。

C-15 はカキから多く検出されたのに対し、カキ事例から検出されておらず、乳幼児の下痢症患者からは検出されていることから、乳幼児には病原性を有するものの、成人では病原性が弱いあるいは、既に多くのヒトが抗体を保有していることによるものか、更に調査する必要がある。

分子疫学的に研究をすると、ノロウイルスの動向あるいは病原性を明らかにできることが示唆され、今後さらに研究すべき重要なことと考えている。

## 6. 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

地域での小学校で感染性胃腸炎の集団発生があり、検出したノロウイルスは、第39週（10月1日）に採取した父母を含む家庭内発生による小児感染性胃腸炎検出株と同一の新潟株であった。同小学校での発生はその後、家庭内感染を引き起こし、同町の中学生や保育園でも患者発生が確認され、さらには隣接市町村の保育所でも集団発生がみられた。この時期、41週のその地域の定点あたりの報告数は第41週6.5と急増し、その後隣接町村の保育所でも集団発生が確認された43週での報告数は9.5と県内で最高の数値となった。すなわち、患者の定点の報告で5.0を越すと集団発生が起こることが予測さ

れた。今後この患者数5を越えそうになったときには注意報等の広報活動、予防策の徹底が必要であると考えられた。

2003年から2004年にかけて県内各地の小児感染性胃腸炎患者と病院、保育所、学校、養護施設、介護老人施設等における感染性胃腸炎集団事例の糞便からアミノ酸配列で100%一致するノロウイルスのGⅡに属するMaryland 6 タイプ類似株（新潟株）を主流とする流行が確認された。介護老人施設で集団発生した6件中3件では、入院先の病院で医療スタッフへの二次感染が認められ、今期流行のノロウイルスの新潟株は感染性が非常に強いことが推定された。また、嘔吐、下痢等の臨床症状はこれまでのより少し強く、持続期間も多少長い様であった。このことより、新潟株はMaryland 6 タイプ(GⅡ)類似株ではあるが、これまでの報告がない新しい型の可能性が示唆され、ウイルス学的検討は現在進行中である。なお、類似の国内の報告はまだ無い。欧州での2002年にGⅡ4のバリエーションによる流行が報告され、患者数の増加、時期的にも春や初夏とこれまでとは異なる疫学形態を示し、新型ではないかともされ、我々の株との異同の検討が必要と思われた。

## 7. 下痢原性大腸菌の食品汚染と遺伝子診断法の確立

大腸菌における生物活性の測定法として、簡便なコンタクトヘモリシス法を検討した。eae 型によって異なる条件を使う必要がある。標準的な FAS 試験の改良法をした。また、EspB の分泌は生物活性とよく相関し、イムノクロマト法等の利用が可能と思われた。

局在性付着大腸菌では、(1) 同じ eae

遺伝子型 ( $\gamma$ ) に含まれる 055:H7 と 0157:H7 の *espA* 遺伝子は、0157:H7 の配列から設計したプライマーで検出された。データベースでは配列はかなり異なっているが、少なくとも日本の分離株はよく似た型と推測される。(2)EPEC の病原性試験として標準的な FAS 法は判定が困難であるが、アクチンの蓄積を FITC-フェロイジンで、菌を DAPI で染色することで判定が容易となった。(3)H 抗原検査は何度も運動性強化を行う必要があり、時間と手間がかかる。PCR による検査法を検討した。EPEC カテゴリーを多く含む H2、H6、H8 及び H11、H21 を 2 回の Multiplex PCR で検出することが可能となった。

食品の汚染状況調査の対象に漬物以外に茹で麺、生カキを加えた。セレウス菌分離を目的に、浅漬け 37 検体と麺類 19 検体を調査した。陽性がそれぞれ 8 件 (21.6%) と 6 件 (31.6%) で、分離されたセレウス菌はほとんどがエンテロトキシンが陽性であった。また、下痢原性大腸菌分離を目的に、生カキ 36 検体を調査した。19 検体 (52.8%) が陽性であった。3 検体が基準 (食品衛生法、生食用生カキの規格基準: 最確数 230/100g 以下) をオーバーしていた。市販血清で型別できた株の血清型は 0153 (3 株)、08 (2 株)、0126 (1 株) であった。既知病原因子 (LT, ST, VT, 侵入性) は検出されなかった。0153 が分離された生カキの加工場の周辺海域の環境調査を実施したところ、海水から 0153 を分離した。このことからかきについて細菌の検査も必要であると考えられた。

#### D. まとめ

本研究は食品の微生物学的安全性の確

保により国民の健康維持・増進を目的として、検査法の開発・改良、国産および輸入魚介類におけるウイルス汚染実態調査、環境中のウイルス汚染実態、食品媒介集団発生状況、分子疫学学的解析、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および下痢原性大腸菌の食品汚染と遺伝子診断法の確立についての研究を行い、多くの成果を挙げることができた。

#### E. 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 (GI, GII) 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定研修新興再興感染症技術研修の主任を併任しており、9月に開催された平成15年度の研修でノロ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。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

鈴木宏：感染性胃腸炎（ロタウイルスについて）、*Infectious Diseases Report*、6:2003

西川眞：ノーウオークウイルスによる急性非細菌性流行性胃腸炎と小児急性胃腸炎の分子疫学的研究、*新潟医学会誌*、117:251-264、2003

鈴木宏：SRSV(小型球形ウイルス)、*化学療法の領域*、17:1897-1902、2001

Nishida T, Kimura H, Saitoh M, Shinohara M, Kato M, Fukuda S, Munemura T, Mikami T, Kawamoto A, Akiyama M, Kato Y, Nishi K, Kozawa K, Nishio O: Detection, quantitation, and phylogenetic analysis of noroviruses in Japanese oysters. *Appl Environ Microbiol.* 69(10):5782-5786, 2003

Kimura H, Saitoh M, Miyakubo H, Yoshida H, Kato M, Nagai A, Kozawa K: Keratoconjunctivitis caused by echovirus type 13 in Japanese children. *Pediatr Infect Dis J.* 22(8):758-759, 2003

Tran T-T Huy, Ushijima H, Ngoc TT, Ha LD, Hayashi S, Sata T, Abe K:

Recombination of genotype B and C in hepatitis B virus isolated from a Vietnamese patient with fulminant hepatitis. *Jpn J Infect Dis.* 56:35-37, 2003

Zhou Y, Li L, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H: Distribution of Human Rotaviruses, especially G9 Strains, in Japan from 1996 to 2000. *Microbiol Immunol.* 47:591-599, 2003

Schroder HC, Ushijima H, Krasko A, Gamulin V, Thakur NL, Diehl-Seifert B, Mueller WEG: Emergence and disappearance of an immune molecule, an antimicrobial lectin, in basal metazoa, a tachylectin-related protein in the sponge *Suberites domuncula*. *J Biol Chem.* 278:32810-32817, 2003

Huy TT Tran, Ushijima H, Quang X, Phuong N, Li TC, Hayashi S, Lien TX, Sata T, Abe K: Prevalence of hepatitis virus types B through E and genotypic distribution of HBV and HCV in Ho Chi Minh City, Vietnam. *Hepatology Research.* 26:275-280, 2003

Komoriya T, Kohno H, Kimura A, Ushijima H: The development of sensitive latex agglutination tests for detecting astroviruses (serotype 1 and 3) from clinical stool specimen. *JARMAN.* 13:103-114, 2003

Okame M, Yan H, Akihara S, Okitsu S,

- Tani H, Matsuura Y, Ushijima H : Evaluation of a newly developed immunochromatographic method for detection of Norovirus. *J J A Infect Dis.* 77:637-639, 2003
- Yan H, Yagyu F, Okitsu S, Nishio O, Ushijima H : Detection of norovirus (GI, GII), sapovirus and astrovirus in fecal samples using reverse transcription single-round multiplex PCR. *J Virol Methods.* 114:37-44, 2003
- Huy T T-T, Ushijima H, Win KM, Luengrojanakul, Shrestha PK, Zhong ZH, Smirnov AV, Taltavull TC, Sata T, Abe K : High prevalence of hepatitis B virus pre-S mutant in countries where it is endemic and its relationship with genotype and chronicity. *J Clin Microbiol.* 41:5449-5455, 2003
- Phan PG, Tuan NA, Okame M, Maneekarn N, Nishio O, Okitsu S, Ushijima H : Human astrovirus, Norovirus (GI, GII), and Sapovirus infections among diarrheal children in Pakistan. *J Med Virol.* (in press)
- Hansman GS, Katayama K, Maneekarn N, Peerakome S, Khamrin P, Tonusin S, Okitsu S, Nishio O, Takeda N, Ushijima H : Genetic diversity of Norovirus and Sapovirus in hospitalized infants with sporadic cases of acute gastroenteritis in Chiang Mai, Thailand. *J Clin Microbiol.* 42(3):1305-1307, 2004
- Hansman GS, Doan LT, Katayama K, Kgyuen TA, Okitsu S, Kato Y, Nishio O, Takeda N, Ushijima H : Norovirus strains belonging to the Lordsdale virus cluster are a major cause of acute sporadic infantile gastroenteritis in Ho Chi Minh city, Vietnam. *J Clin Microbiol.* (submitted)
- Adhikary AK, Inada T, Numaga J, Suzuki E, Ushijima H, Banik U, Mukoyama A, Matsuno S : Characterization of hexon and fiber genes of a novel strain of adenovirus involved in epidemic keratoconjunctivitis. *J Clin Pathol.* 57: 95-97, 2004
- Sakamoto T, Ushijima H, Okitsu S, Suzuki E, Sakai K, Morikawa S, Muller WEG : Establishment of an HIV cell-cell fusion assay by using two genetically modified HeLa cell lines and receptor gene. *J Virol Methods.* 114:159-166, 2003
- Huy Tran T-T, Ushijima H, Quang VX, Win KM, Luengrojanakul P, Kikuchi K, Sata T, Abe K : Genotype C of hepatitis B virus can be classified into at least two subgroups. *J Gen Virol.* 85:283-292, 2004
- 原みゆき、古屋由美子、片山丘、今井光信 : ウイルス性食中毒の発生状況 (平成14年度)、神奈川県衛生研究所研究報告、33 : 80-82、2003
- 入谷展弘、勢戸祥介、久保英幸、小笠原