

準、春木孝祐：保育所で発生したノーウォーク様ウイルスによる集団胃腸炎事件 - 大阪市 -、病原微生物検出情報、22：317、2001

Belliot G, Noel J, Li J, Seto Y, Humphrey C, Ando T, Glass RI, Monroe SS: Characterization of capsid genes, expressed in the baculovirus system, of three new genetically distinct strains of "Norwalk-like viruses". *J Clin Microbiol.* 39:4288-4295, 2001

Iritani N, Seto Y, Kubo H, Haruki K, Ayata M, Ogura H: Prevalence of 'Norwalk-like virus' infections in outbreaks of acute nonbacterial gastroenteritis observed during the 1999-2000 season in Osaka City, Japan. *J Med Virol.* 66: 131-138, 2002

勢戸祥介、入谷展弘、久保英幸、阿部仁一郎、村上司、春木孝祐：事業所給食によるノーウォーク様ウイルス食中毒事例 - 大阪市 -、病原微生物検出情報、23：64-65、2002

久保英幸、入谷展弘、勢戸祥介、村上司、春木孝祐：感染性胃腸炎患者からのパレコウイルス1型および2型の分離 - 大阪市 -、病原微生物検出情報、23：64、2002

Iritani N, Seto Y, Kubo H, Murakami T, Haruki K, Ayata M, Ogura H: Prevalence of Norwalk-like virus infections in cases of viral gastroenteritis among children in Osaka City, Japan. *J Clin Microbiol.* 41:1756-1759, 2003

勢戸祥介、入谷展弘、小倉壽：ウイルスによる食中毒、*医薬ジャーナル*、39：1457-1461、2003

入谷展弘、久保英幸、勢戸祥介、春木孝祐、西尾治、武田直和、村上司、簗城昇次、改田厚、綾田稔、小倉壽：平成 14

年度に検出されたノーウォークウイルスの遺伝子型別、大阪市立環境科学研究所報告 調査・研究年報、平成 14 年度版第 65 集：29-37、2003

入谷展弘、勢戸祥介：ノロウイルス感染症、*生活衛生*、47：34-39、2003

西田知子、野田衛、三上稔之、篠原美千代、春木孝祐、大瀬戸光明、加藤由美子、秋山美穂、西尾治：市販生食用カキのノロウイルス汚染状況、病原微生物検出情報、24：317、2003

藤本嗣人、近平雅嗣、芥川宏、西尾治：兵庫県阪神地域における妊婦および 0-9 歳児のコクサッキーB 群ウイルスに対する中和抗体保有状況について、*兵庫県立健康環境科学研究所年報*、2：103-106、2003

藤本嗣人、近平雅嗣、秋山美穂、西尾治：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、*兵庫県立健康環境科学研究所年報*、2：107-110、2003

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が、兵庫県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、*ひょうごの公衆衛生*、18：23-24、2003

岡藤隆夫、岡藤輝夫、藤本嗣人、近平雅嗣：アデノウイルス感染症 - 免疫クロマト法による迅速診断法の有用性について -、*外来小児科*、6：293-295、2003

近平雅嗣、藤本嗣人、池野まり子、押部智宏：2002/2003 シーズンのノロウイルスの施設内流行事例—兵庫県、病原微生物検出情報、24：319-320、2003

藤本嗣人、近平雅嗣、岡藤輝夫、岡藤隆夫：アデノウイルスによる滲出性扁桃炎—兵庫県、病原微生物検出情報、24：136-137、2003

西尾治、西香南子、福田伸治、西田知子、篠原美千代、三上稔之、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、31：163-170、2003

新川奈緒美、伊東祐治、西尾治、他：2002年に流行したエコーウイルス 13 型の分子疫学的解析、鹿児島県環境保健センター所報、4:55-57、2003

新川奈緒美、藏元強、川元孝久、吉永正夫 他：2003年の麻疹の流行—鹿児島県、病原微生物検出情報、25:69-70、2004

杉枝正明、古屋由美子、大瀬戸光明、藤本嗣人、新川奈緒美、田中俊光、長谷川斐子、秋山美穂、西尾治：輸入生鮮魚介類におけるノロウイルス汚染状況、病原微生物検出状況報、24:317-318、2003

川本歩、松本尚美、細井亮：ヒトと環境およびカキから検出した Norwalk Virus の疫学的検討、鳥取県衛生研究所報、41：35-39、2001

川本歩、松本尚美、細井亮：イワガキと海水からの小型球形ウイルス調査結果、

鳥取県衛生研究所報、42：64-65、2002

野田衛、西尾治、秋山美穂、国井悦子、藤井彰人、池田義文、平崎和孝、荻野武雄：市販カキにおけるノロウイルスの定量的汚染調査、広島市衛生研究所年報、22：61-66、2003

篠原美千代：SRSV の検査法、HACCP、9：30-33、2003

Hirose K, Ito K, Arakawa E, Tamura K, Watanabe H: DNA-based diagnosis method for typhoid fever and paratyphoid fever, and the screening method for *Salmonella enterica* serovar Typhi and serovar Paratyphi A with decreased susceptibility to fluoroquinolones by PCR-restriction fragment length polymorphism(RFLP). Res Adv Microbiology. 3:109-121, 2003

Young-Hee L, Hirose K, Izumiya H, Arakawa E, Takahashi H, Terajima J, Ito K, Tamura K, Sung-Il K, Watanabe H: Multiplex polymerase chain reaction assay for selective detection of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Jpn J Infect Dis. 56:151-155, 2003

Phan TG, Okame M, Nguyen TA, Maneekarn N, Nishio O, Okitsu S, Ushijima H : Human astrovirus, Norovirus (GI, GII), and Sapovirus infections in Pakistan children with diarrhea. J Med Virol. 73:256-261, 2004

杉枝正明、新川奈緒美、大瀬戸光明、徳竹由美、山口卓、秋山美穂、西尾治：Norovirus 感染により排泄されるウイルス量について、臨床とウイルス、32(印刷中)、2004

新川奈緒美、川元孝久、秋山美穂、加藤由美子、西尾治：吐物が感染源と推察されたノロウイルス集団胃腸炎事例について、臨床とウイルス、32(印刷中)、2004

安藤克幸、森永康裕、藤原義行：生食用カキの採取海域海水、感染性胃腸炎及び食中毒事例からのノロウイルスの検出、佐賀県衛生薬業センター所報、28、2004

福田伸治、高尾信一、河崎智彦、山本一夫、住井賢一、正岡亮太、片平尚貴、島津幸枝、宮崎佳都夫：感染経路が解明された Norwalk virus 食中毒事例、広島県保健環境センター研究報告、10:15-18、2002

福田伸治、高尾信一、桑山勝、島津幸枝、宮崎佳都夫：小児科領域の検体から検出した Sapovirus の遺伝子学的解析、広島県保健環境センター研究報告、11:27-29、2003

福田伸治、高尾信一、桑山勝、島津幸枝、宮崎佳都夫：ウイルス性食中毒の発生の特徴、日本食品微生物学会雑誌、20(4):203-209、2003

福田伸治、宮崎佳都夫：乳幼児感染性胃腸炎患者における Norwalk virus, Sapporo virus および Human astrovirus の検出状況と流行型、感染症学雑誌、77:965-970、2003

福田伸治：アストロウイルス、総合臨床、51:2971-2975、2002

Fukuda S, Takao S, Shimazu Y, Miyazaki K : An application of microplate hybridization assay for the confirmation and probe typing of "Norwalk-like viruses". Microbiol Immunol. 46(7):495-498, 2002

Fukuda S, Takao S, Shimazu Y, Miyazaki K : Prevalence of Norwalk viruses in Southern and Northern parts of Hiroshima Prefecture, Japan in 2000/2001 season. Jpn J Infect Dis. 54:153-154, 2001

Li L, Shimizu H, Doan LTP, Tung PG, Okitsu S, Nishio O, Suzuki E, Seo JK, Sim JG, Muller WEG, Ushijima H : Characterizations of Adenovirus Type 41 isolates from children with acute gastroenteritis in Japan, Vietnam and Korea. J Clin Microbiol (in press)

大瀬戸光明、山下育孝、近藤玲子、豊嶋千俊、井上博雄：ELISA 法による *Norovirus* 抗原検出キットの性能評価、医学と薬学、50 : 721-726、2003

植木洋、秋山和夫、渡辺徹、大村達夫：遺伝子相同性にもとづく *Norovirus* (NV) のカキへの汚染経路の解明、環境工学研究論文集、40 : 607-616、2003

西尾治：ノロウイルス検査法の改訂、食品衛生研究、54(2):9-15、2004

西尾治：ノロウイルスによる食中毒の発生とその防止について、Kewpie News、357号、2003

山上隆也、大屋とし子、中澤美佳子、窪田玲子、望月町子、大石陽子、嶋村博、秋山美穂、西尾治：最近2年間に小児から検出された下痢症ウイルスについて-A群ロタウイルスのG血清型別結果-、山梨中病年報、30：80-81、2003

徳竹由美、中村友香、横内文子、村松紘一、西尾治：長野県における食中毒集団発生事例からのノロウイルスの検索、長野県衛公研報告、26：16-22、2003

2. 学会発表

新川奈緒美、秋山美穂、西尾治：吐物による感染が推察されたNorovirus集団胃腸炎事例、第44回臨床ウイルス学会、2003年6月26-27日、鹿児島

杉枝正明、新川奈緒美、大瀬戸光明、西尾治：Norovirus感染により排泄されるウイルス量について、第44回臨床ウイルス学会、2003年6月26-27日、鹿児島

森伸生、砂川富正、多屋馨子、谷口清州、西尾治、岡部信彦：2002年に感染症発生動向調査へ報告されたA型肝炎のまとめ、第44回臨床ウイルス学会、2003年6月26-27日、鹿児島

藤本嗣人、近平正嗣、西尾治：コクサッキーB群ウイルスに対する小児および妊婦の抗体保有調査、第44回臨床ウイルス学会、2003年6月26-27日、鹿児島

顔海念、柳生文宏、沖津祥子、西尾治、牛島廣治：下痢症ウイルスの迅速診断法の開発—RT-multiplex PCR法を用いた糞便検体からのノロウイルス(GI, GII)、サポウイルス、アストロウイルスの同時検出、第51回日本ウイルス学会、2003年10月27-29日、京都

新川奈緒美、吉澄志磨、福田伸治、西香南子、杉枝正明、古屋由美子、三上稔之、西田知子、牛島廣治、秋山美穂、岡部信彦、西尾治：全国各地で発生したノロウイルス(NV)による食中毒事例について、第51回日本ウイルス学会、2003年10月27-29日、京都

西田知子、野田衛、三上稔之、篠原美千代、春木孝祐、大瀬戸光明、秋山美穂、西尾治：市販生食用カキのノロウイルスおよびA型肝炎ウイルス汚染状況、第51回日本ウイルス学会、2003年10月27-29日、京都

西香南子、福田伸治、篠原美千代、大瀬戸光明、植木洋、西尾治：カキ及び養殖海域のNV汚染調査とカキ筏における水平垂直分布調査、第51回日本ウイルス学会、2003年10月27-29日、京都
勢戸祥介、入谷展弘、久保英幸、改田厚、春木孝祐、西尾治、綾田稔、小倉壽：平成14年度に大阪市で検出されたNorwalk virusの遺伝子型別、第51回日本ウイルス学会、2003年10月27-29日、京都

杉枝正明、古屋由美子、大瀬戸光明、藤本嗣人、新川奈緒美、田中俊光、山口卓、長谷川斐子、西尾治：輸入生鮮魚介類におけるウイルス汚染状況について、第51

回日本ウイルス学会、2003年10月27-29日、京都

原みゆき、古屋由美子、片山丘、今井光信：2002年～2003年に発生したウイルス性食中毒について、第49回神奈川県公衆衛生学会、2003年、横浜

勢戸祥介、入谷展弘、久保英幸、春木孝祐、名取克郎、武田直和、綾田稔、小倉壽：Alphatron type NV について、衛生微生物技術協議会第24回研究会、2003年7月

入谷展弘、久保英幸、勢戸祥介、春木孝祐、西尾治、武田直和、村上司、箕城昇次、改田厚、綾田稔、小倉壽：平成14年度に検出された Norwalk virus のプロトタイプ型別および遺伝子型別、平成15年度地方衛生研究所全国協議会近畿支部ウイルス部会総会、2003年9月

入谷展弘、久保英幸、勢戸祥介、春木孝祐、村上司、改田厚、綾田稔、小倉壽：小児急性胃腸炎患者から検出されたノロウイルスの分子疫学的解析、第51回日本ウイルス学会、2003年10月27-29日、京都

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：分子系統学的手法によるエンテロウイルス同定のためのクラスタリング尺度の設定、第44回日本臨床ウイルス学会、2003年、鹿児島

藤本嗣人、近平雅嗣、西尾治、岡藤輝夫、岡藤隆夫：平成15年に兵庫県で発生した過去10年間で最大規模の咽頭結膜熱の

流行時におけるウイルス検索結果および臨床現場におけるアデノウイルス迅速診断キットの有効性に関する検討、平成15年度兵庫県公衆衛生協会中央研究会、2003年、神戸

西香南子、山内昭則、杉山明、中山治、西尾治：2002/2003 シーズンに三重県で検出された Norovirus の解析、第24回日本食品微生物学会学術総会、2003年、岡山

新川奈緒美、本田俊郎、吉國謙一郎、上野伸広、有馬忠行、永田告治：1999-2000年のロタウイルスのG血清型、第43回鹿児島県公衆衛生学会、2001年、鹿児島

新川奈緒美、伊東祐治、西尾治、他：ノロ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年、鹿児島

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年、宮崎

新川奈緒美、中山浩一郎、伊東祐治、西尾治：Norwalk virus による胃腸炎集団発生患者から排泄されるウイルス量と遺伝子型について、第50回日本ウイルス学会、2002年、札幌

新川奈緒美、伊東祐治、西尾治、他：ノロウイルスによる食中毒と乳幼児下痢症の発生及び海域汚染について、第45回鹿児島県公衆衛生学会、2003年、鹿児島

神田隆、杉枝正明、乾あやの、秋山美穂、西尾治：胃腸炎患者および健康人からの *Norovirus* の検出について、第 45 回日本臨床ウイルス学会、2004 年 6 月、大阪

野田衛、西尾治、国井悦子、藤井彰人、池田義文、平崎和孝、荻野武雄：市販カキにおけるノロウイルスの定量的汚染調査、全国公衆衛生獣医師協議会平成 15 年度調査研究発表会、2003 年 9 月 5 日、東京

影山努、小嶋慈之、高井玲子、星野文則、福士秀悦、篠原美千代、内田和江、岡智一郎、武田直和、片山和彦：*Norovirus* の多様性およびその疫学的な意義について、第 51 回日本ウイルス学会、2003 年 10 月 27-29 日、P295 京都

古川友子、伊藤健一郎他：下痢原性大腸菌の *cesT* 遺伝子多型は *tir* 遺伝子型と一致する、第 77 回日本細菌学会総会、2004 年 4 月、大阪

山崎貢、伊藤健一郎他：腸炎ビブリオの耐熱性溶血毒素類似毒（TDH-related hemolysin:TRH）陽性株の分布及び TRH 遺伝子の塩基配列解析について、第 78 回日本感染症学会総会、2004 年 4 月、東京

松下秀、伊藤健一郎他：腸管出血性大腸菌ベロ毒素遺伝子の LAMP 法を利用したタイピング試薬キットの検討、第 78 回日本感染症学会総会、2004 年 4 月 6-7 日、東京

古川友子、伊藤健一郎他：病原血清型大

腸菌の *eae*、*tir*、*cesT* 遺伝子多型、第 76 回日本細菌学会総会、2003 年 4 月、奈良

伊豫田淳、伊藤健一郎他：LEE 遺伝子群非保有型志賀毒素産生性大腸菌に存在する病原性遺伝子の解析型、第 76 回日本細菌学会総会、2003 年 4 月、奈良

徳竹由美、中村友香、横内文子、村松絃一、西尾治：*Norovirus* が検出された非発症従事者の糞便中ウイルス量、第 18 回地研全国協議会 関東甲信静支部ウイルス研究部会、2003 年 9 月

平潟洋一、有澤孝吉、西尾治、中込治：長崎市のレストランで発生したノロウイルス GII メキシコ株の集団食中毒、第 78 回日本感染症学会総会、2004 年 4 月 6-7 日、東京

II

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 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)

厚生科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）

平成 13～15 年度総合研究報告書

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、ノロウイルスは病因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。さらに A 型肝炎ウイルス感染患者には食品を介するものも存在し、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。

食品中のウイルスを定量することを目的として、ノロウイルス、サポウイルスおよび A 型肝炎ウイルスについてリアルタイム PCR 法の開発・改良を行い、食品中の汚染ウイルスを定量的に検出できるようにした。

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 (G1) と Genogroup II (G2)、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。しかし 10 コピー以下のものには陽性も相当数含まれ、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、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、国内産食用生カキでは 8%、加熱用カキでは 23%からノロウイルスが検出された。生食用

生カキ 2 件 (1%) から極めて微量の A 型肝炎ウイルスが検出された。なお、直ちに同一養殖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。このことから一時的に少量の A 型肝炎ウイルスの汚染が生じたと推察された。E 型肝炎ウイルスは検出されなかった。

平成 13 年および 14 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。しかし平成 15 年度はカキ事例による食中毒事例は極めて少数であった。10 月からカキの NV 陽性が見られ、2 月まで陽性が続いたものの 12 月から 2 月の降水量が非常に少なく、このことはカキ事例が少なかったことの要因の一つとして考えられ、またカキのノロウイルス汚染量は少量であった。

環境中のウイルス動向、すなわち下水処理場の流入、放出水、河川水、海水およびカキの汚染との関連では、ウイルスが下水処理場の流入水には 10 月には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 1/100~1/100,000 以下に除去された (図 3)。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 (図 4)。

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た。このことは乳幼児の急性胃腸炎により大量に排泄されるウイルスがカキを汚染させる要因として考えられた。

今後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たので、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と考えられた。

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事例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て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し、複数の患者から検出される遺伝子型は殆どが同一であった。

食中毒原因食材と推定され同一パックあるいは海域のカキでは 39 事例のうちリアルタイム PCR で実測値 10 コピー以上を示したのは 39 事例中 23 事例(59%)に見られた。

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 707 件中 121 件(17%)から検出された。A 型肝炎ウイルスは 6 件(1%)に認められ、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。

ノロウイルスでは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共に侵入してきており、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発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、他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 G2 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。特に、2000 年以降ヨーロッパでは病原性の強いノロウイルスによる集団発生が多発しており社会的に大きな問題となっており、わが国でも新しい病原性の強い遺伝子型の監視と対策を早急に樹立しなければならない。

局在性付着大腸菌では血清型または *eae* 遺伝子型により、病原性に関連する遺伝子に変異または欠損があること、遺伝子型により増菌培地による影響を受けること、分泌タンパクである EspB の発現は生物活性と関連していた。

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。

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。

白菜以外の漬物及び生鮮野菜漬物では、腸管出血性大腸菌 0157 と他の病原大腸菌及びサルモネラは全て陰性であった。黄色ブドウ球菌は 1 件（小松菜）から検出された。大腸菌は公定法では 4 件（9.3%）だけであったが、食中毒検査法では 8 件（18.6%）から検出された。セレウス菌は 23 件（53.5%）から検出され、分離株の半分以上に下痢性毒素の産生性が見られた。

一方、生鮮野菜からは病原菌は検出されなかったが、*Klebsiella*、*Citrobacter*、大腸菌が検出された。

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：東京大学大学院医学部研究科教授

鈴木宏：新潟大学大学院医歯学総合研究科国際感染医学講座教授

藤本嗣人：兵庫県立健康環境科学研究所感染症部主任研究員

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微生物部主任研究員

木村博一：群馬県立衛生環境研究所調査研究グループ独立研究員

研究協力者

沖津祥子、顔海稔、大亀路生：東京大学

坂井胤、齋藤玲子：新潟大学

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、筒井理華、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
稲吉恵、佐原啓二：静岡県環境衛生科学研究所
中嶋洋：岡山県環境保健センター
山崎貢：愛知県衛生研究所
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所
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
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：千葉市環境保健研究所
古田敏彦：浜松市保健環境研究所
田村努、西川眞、篠川旦：新潟県保健環境科学研究所
吉田弘：国立感染症研究所 ウイルス 2 部
秋山美穂、加藤由美子、山口卓、愛木智香子、阿部陽子 齋藤利江、
山下和予、長谷川斐子、岡部信彦：国立感染症研究所 感染症情報センター

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。実際にわれわれは輸入食品を介してのA型肝炎ウイルスによる食中毒事例を報告している。近年はE型肝炎ウイルスも社会的な問題となっている。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ので明らかにする必要がある。

近年消費者の健康への関心は高く、食の安全が強く要求されている。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。

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。そのような国から、生鮮魚介類が大量にわが国に入ってきている。これらの食品を介してウイルスが侵入する危険性が予測されるので本研究に取り上げた。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ので、ポリオウイルスを含むエンテロウイルスの汚染状況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。

環境中のノロウイルスの動向を明らかにする目的で浄化処理施設

への流入水および放流水、河川水、海域の動向・消長とカキ汚染の関連性を調査した。

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り、養殖筏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、下層での垂直汚染状況を調査・研究した。

自生カキ、ヒオウギ貝、プランクトンにおけるノロウイルス汚染を調査した。

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・研究を緊急に行うことにした。

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。この要因として、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。

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。EPEC の病原性試験としてアクチンの蓄積を FITC-ファロイジンで検討した。

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での検出が可能か否かについて実施した。

大腸菌における生物活性の測定法として、標準的なFAS試験の改良を検討した。

食品の汚染状況調査のセレウス菌および大腸菌汚染についての調査研究を行った。

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ことを第一目的とした。

B. 研究方法

1. 検査法の確立・検討

ノロウイルスの新しい遺伝子型に対応するプライマー、プローブの検討を行った。

A型肝炎ウイルス、サポウイルスの食品汚染を定量的に明らかにする目的で両ウイルスのリアルタイムPCR法を開発・改良を実施した。

海水の濃縮法について検討を行い、最も優れていた方法を本研究班の標準法とした。

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GenogroupIとGenogroupII(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てポリオウイルス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のノロウイルス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1stPCR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989パック、加熱用カキ64パックについて、1パックにつき平成13年度はカキ5個を1件として検査をおこなったが、平成14年度および15年度はカキ3個を検査に用いた。

食中毒事例原因カキは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。

同一パックのカキ3個におけるノロウイルス定量値分布について、延620パックを検討した。

2) 輸入生鮮魚介類

輸入魚介類は 707 件について行ったが、主な輸入国は中国 359 件、韓国 234 件、北朝鮮 65 件で、主な貝種はアカガイ 264 件、ハマグリ 251 件、カキ 55 件、タイラギ 42 件、アサリ 40 件で、その他ブラックタイガー等であった。

平成 13 年度は貝類の中腸腺 3g を 1 件として、平成 14、15 年度は貝類の個々の中腸腺 1g について 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 {カブ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

E 海域の 5 地点で同一筏のカキにおけるウイルス汚染を、毎年月に 1 回カキを 5 個採取しノロウイルス汚染を調べた。さらに海水の汚染についても実施した。

カキ筏における部位別による汚染を明らかにする目的で、加熱および生食用養殖筏の上層(海面下

0.5m)、中層(海面下 7m)、下層(海面下 13m)におけるカキのノロウイルス汚染を調査した。

プランクトンについてノロウイルスの汚染を調査した。

A 海域の 3 処理施設および D 海域の 1 施設で水処理施設に流入水、処理施設の放流水、河川水、海水についてノロウイルスの環境汚染、消長についてその実態を明らかにすることにした。

E 海域では降雨量、海水温とカキの汚染との関連性について追求することとした。

4. 食品媒介集団発生状況

食品媒介集団発生 265 事例を調査した。カキ関連食中毒 91 事例からの患者ふん便 588 件、食品取扱者ふん便 350 件、吐物 5 件および食品 87 件についてノロウイルス検査を行った。64 事例からの RT-PCR 法で増幅された産物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 174 事例の患者ふん便 1284 件、食品取扱者ふん便 942 件、吐物 63 件、食品 358 件についてノロウイルス検査を行った。86 事例について RT-PCR 法で増幅された産物の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 115 件、乳幼児下痢

症患者のふん便 137 件、食中毒カキ事例の患者ふん便 61 事例、食品取扱者ふん便 9 事例、患者吐物 1 事例、食品（カキ）9 事例、食品取扱者事例の患者ふん便 81 事例、食品取扱者ふん便 28 事例、患者吐物 8 事例について、カブ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ミュレーション

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 (γ) 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を検討した。(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。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

本研究を実施するに当たり、食品から少ないウイルスを検出するには、高感度、かつ定量が行えるということが最も重要である。そこで、われわれはリアルタイム PCR 法を導入することにした。リアルタイム PCR 法はノロウイルスについては検査法が論文として発表さ

れていたが、A型肝炎ウイルスおよびサポウイルス（サッポロウイルス）では確立されていなかったため、これらのウイルスについてリアルタイム PCR 法を設定した。また、ノロウイルスについては平成 13 年、食監発第 267 号「ノーウォーク様ウイルス (NLV) の RT-PCR 法について」として、A型肝炎ウイルスについては平成 14 年、食監発第 0816001 号「ふん便及び食品中の A 型肝炎ウイルスの検査法について」として厚生労働省医薬局食品保健部監視安全課から全国の自治体に標準法として通知した。

平成 14 年にはノロウイルス検出に用いている RT-PCR 法のプライマーおよびプローブは、アルファトロン型を検出できないことが明らかとなったので、検出可能な RT-PCR 法およびリアルタイム PCR 法のプライマーおよびプローブの設定をした。これによりノロウイルスの検出がより確実性を増した。この改定したプライマー、プローブは平成 15 年、食安監発第 1105001 号「ノロウイルスの検出法について」として厚生労働省医薬食品安全部監視安全課から通知を行い、現在厚生労働省の検査法として全国の地方衛生研究所等で実際に行われている。

患者のふん便からノロウイルスを 30 分以内に検出できるイムノクロマト法の開発について NV1207 株

(G2/1 クラスター) を用いて行ったところ、本方法は簡便、且つ迅速に結果が得られた。今後多くの遺伝子型に対応が可能となれば、実用性が一層増すものと考えられ、今後の研究が期待される。

カキ等の中腸腺に存在するウイルス量は極めて少量であり、ウイルスを効率よく抽出することは、検査の正確性を保持する意味からも重要である。そこでウイルスの回収について細胞破碎法と超遠心法を比較した結果、ノロウイルスの回収は細胞破碎法がより高かった。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。この方法を採用することにより検査精度が向上する。

下痢症を引き起こすウイルスにはノロウイルスの Genogroup I と Genogroup II (GI, GII)、Sapovirus、Astrovirus の 4 種のウイルスが主なものとして存在している。この 4 種のウイルス検出を 1 本のチューブで行える方法を検討したところ、1 本のチューブで 4 種類のウイルス検出が可能であることが示された。この方法を行うことにより、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 法ともに陽性であったことから実測値が 10 コピー以上のときには陽性と判断して間違いないものと考えられた。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。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取り扱いの検討が不可欠であり、早急に基準を作成しなければならないと考えている。

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 当たりに換算すると 125 コピーとなる。エビ類は腸管 200g を採取し検査した。

国産生食用カキは 989 件中 77 パック (8%) が実測値 10 コピー以上を示し、これらは陽性と判断された。月別の 10 コピー以上のものは 10 月が 3%、11 月は 5% が陽性であった。平成 13 年度および 14 年度は 10 月、11 月にノロウイルスに汚染されたカキは見られなかったが平

成 15 年度は 10 月、11 月に陽性が見られた。12 月は 4% で、10 月から 12 月の間は低率であったが、1 月は 13% と最も高く、次いで 2 月が 10% で、この 2 ヶ月間はカキによる食中毒事例の多発時期であり、われわれが調査したカキによる食中毒事例は 12 月～2 月に多発していたことから、カキのノロウイルス汚染とカキによる食中毒発生と良く一致しており、カキ汚染とカキによる食中毒発生事例との関連性が強く示唆された。

986 パックのうち、0 コピーは 658 パック (68%)、 $>0 \sim <60$ は 224 パック (23%)、 $\geq 60 \sim <125$ コピーは 37 パック (4%) であった。 $\geq 125 \sim <300$ コピーは 29 パック (1%)、 $\geq 300 \sim <500$ コピーは 16 パック (2%)、 $\geq 500 \sim <1000$ コピーは 12 パック (1%)、 ≥ 1000 コピーは 20 パック (2%) にノロウイルス汚染が認められた。

カキの検査個数について検討したところ、実測値 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、3 検体全てが陽性というものは陽性が見られた 40 パックのうち 1 パックに過ぎなかった。3 個のうち 1 個のみが陽性は 26 パックで、2 個が陽性は 13 パックであり、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。

加熱用カキは64パックについて、ノロウイルス汚染を調べたところ、15パック(23%)が実測値10コピー以上(1個当たり125コピー)を示した。

従って、加熱用カキはノロウイルス汚染率も高く、更に細菌の汚染も推測されるので、生食しないことが健康被害防止にも重要であると言える。

ホタテ貝、自生カキおよびヒオウギ貝にもノロウイルスが陽性のものが見られ、これらも食中毒の原因食材となりうるので、注意が必要である。

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する必要がある。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、パック単位での判定をする方が、より現実的と考えられる。

平成14年度および15年度に国内産生食用カキからA型肝炎ウイルスがRT-PCR法で検出された。平成14年度のリアルタイムPCRによる定量では非常に低い値で、15年度は陰性であったが、両年共にRT-PCR法で検出された。両年共にA型肝炎ウイルスが検出された同一海域の市販カキ10パック以上を直ちに購入し検査を行ったが、リアルタイムPCRおよびRT-PCR共に陰性であった。このことから両年共にその海域で一時的に微量の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。また、その地域の住民には感染症動向調査での患者報告は無かった。A型肝炎ウイルスは病気も重くなり、わが国の50歳以下の住民は感受性者であること、潜伏期が1ヶ月と長いことから対策が後手となるので、常に汚染についての監視が不可欠である。