



表4. 定点Aの検体から検出されたNVの遺伝子型

定点	年月日	G1			G2		
		下水		海水	下水		海水
		流入水	放流水		流入水	放流水	
		1	2	3	1	2	3
A	平成14年10月			NT			
	平成14年11月						
	平成14年12月						
A	平成15年1月						
	平成15年2月						
	平成15年3月						
A	平成15年8月	C-6	C-8	NT	C-18,C-14		NT
	平成15年9月	-	-	NT	-		NT
	平成15年10月	-	-	NT	-		NT
A	平成15年11月	C-6	-		C-20		NT
	平成15年12月	C-4,C-6	-		C-20		NT
	平成16年1月	C-27	-		C-9,C-10		NT
A	平成16年2月	C-27	-		C-9,C-10		NT
	平成16年3月	C-27	-		C-9,C-14		NT

表5. 定点Bの検体から検出されたNVの遺伝子型

定点	年月日	G1			G2		
		下水		海水	下水		海水
		流入水	放流水		流入水	放流水	
		1	2	3	1	2	3
B	平成14年10月			NT			
	平成14年11月						
	平成14年12月						
B	平成15年1月			C-6			
	平成15年2月			C-6			
	平成15年3月			C-6			
B	平成15年8月	C-6	C-6	NT	C-9,C-10		NT
	平成15年9月	C-6,C-22	C-6	NT	-		NT
	平成15年10月	C-2,C-6,C-22	C-2,C-6	NT	C-10		NT
B	平成15年11月	-	-		C-16,C-19,C-20		NT
	平成15年12月	-	C-27		C-10		NT
	平成16年1月	C-6,C-27	-		C-9,C-20		NT
B	平成16年2月	C-6,C-27	-		C-9,C-20		NT
	平成16年3月	C-6	-		C-9,C-10		NT

表6. 定点Cの検体から検出されたNVの遺伝子型

定点	年月日	G1					G2					
		下水		海水	下水		海水	下水		海水		
		流入水	放流水		流入水	放流水		流入水	放流水			
		1	2	3	4	5(満港)	1	2	3	4	5(満港)	
C	平成14年10月					NT						
	平成14年11月											
	平成14年12月											
C	平成15年1月											
	平成15年2月											
	平成15年3月											
C	平成15年8月	C-6		NT	NT	NT						
	平成15年9月	C-6		NT	NT	NT						
	平成15年10月	C-6		NT	NT	NT						
C	平成15年11月	C-6										
	平成15年12月	C-6,C-27	C-27									
	平成16年1月	C-4,C-6,C-27	-									
C	平成16年2月	C-6,C-27,C-30	C-6									
	平成16年3月	C-6,C-27	-									

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）  
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

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

研究協力者 宮城県保健環境センター 微生物部 植木 洋  
主任研究者 国立感染症研究所 感染症情報センター第六室 西尾 治

研究要旨

カキからのウイルス濃縮法の検討として細胞破碎法と超遠心法を比較した結果、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 NV 濃縮法として有用と考えられた。

感染性胃腸炎患者、流入水・放流水、河川水、養殖カキから検出された一部の NV 遺伝子について解析を行った結果、汚染経路の一つとして感染性胃腸炎患者、下水、河川、カキという経路が強く示唆された。

下水処理場での NV の除去効果を調査した結果、1.2log から 2.6log の除去が確認された。

今回の調査において、NV 定量値(実測値)が 10copy 未満の 5 件について、RT-PCR 法を実施した。その結果、すべての検体について NV 遺伝子が増幅された。定量 PCR において実測値が 10copy 未満の場合データの再現性は低いが、陰性と判断することはさらに検討が必要と考えられた。

A. 研究目的

- 1) 養殖カキの NV 汚染経路の解明。
- 2) 下水処理場における NV の除去効果の評価。
- 3) 感染性胃腸炎患者、下水流入水・放流水、河川水から検出される NV の量的実態把握。
- 4) カキからのウイルス濃縮法の検討。
- 5) 定量陰性基準値 (<10copy) についての検討。

B. 研究材料および方法

1. 研究材料

- ①感染性胃腸炎患者便：  
26 件(A 地区の医療機関で平成 15 年 12

月 1 日～平成 16 年 1 月 28 日の期間中に採取)

②下水処理場流入水(以下流入水)：

6 件(A 地区の下水処理場で平成 15 年 12 月 12, 18, 25 日, 平成 16 年 1 月 6, 15, 26 日に採取)

③水処理場放流水(以下放流水)：

6 件(同上)

④川水：

6 件(A 地区の下水処理場放流水が流れ込む同地区内の河川で平成 15 年 11 月 28 日, 12 月 12, 25 日, 平成 16 年 1 月 6, 15, 26 日に採取)

⑤養殖カキ：

60 件(上記河川が流入している海域で畜

養しているカキで平成 15 年 12 月 8, 12, 18, 25 日, 平成 16 年 1 月 6, 15, 26 日に採取)

## 2. 研究方法

### 1) ウイルスの濃縮

①感染性胃腸炎患者便と養殖カキ(30 件) :

便は公定法により処理を行った。カキは公定法の一つである超遠心法によりウイルス濃縮を行った。なおカキは中腸腺重量に関係なく 1 個体を 1 検体とし 1 回の検査に 5 個体を用いた。

②養殖カキ(30 件) :

細胞破碎法(図-1)

予め  $\phi$  3.2mm のステンレスビーズ 2 個が入れている 1.5ml のチューブにカキ中腸腺 1 個を入れ 500  $\mu$ l の蒸留水を加えた後 Micro Smash™ SM-100 で中腸腺を 4,500rpm 1 分で破碎後 12,000rpm 12 分遠心し上清 140  $\mu$ l から RNA を抽出) ③下水流入水・放流水, 河川水 :

検体 1L を PEG 法により濃縮した。

### 2) ウイルス RNA の抽出

QIAamp Viral RNA mini kit (QIAGEN) を使用し、RNA 誘出量は 60  $\mu$ l とした。

### 3) NV 遺伝子の検出ならびに定量

公定法に準拠し行った。

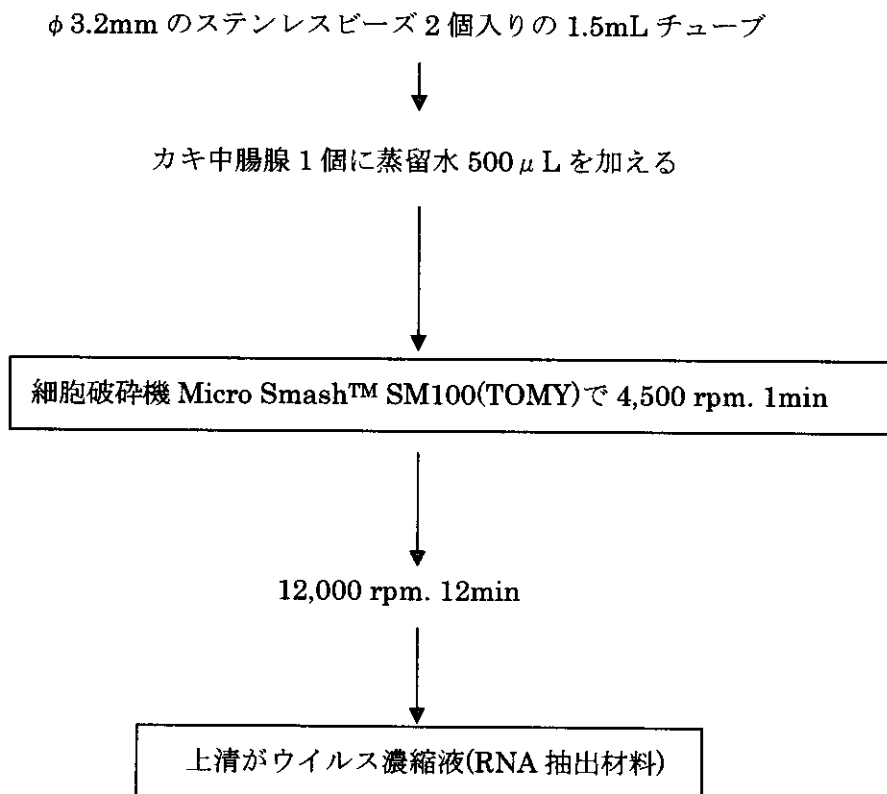


図-1 細胞破碎法

#### 4) 遺伝子解析

PCR法で検出されたNV遺伝子は、増幅産物をdirect sequenceした。同法で塩基配が決定できなかった増幅産物については、cloning後に塩基配列を決定しclustalXでalignment後NJ法にて系統樹を作成した。

### C. 研究成績および考察

#### 1) A地区における感染性胃腸炎患者の推移

A地区における感染性胃腸炎患者数は第48週(11月24日から11月30日)まで10人以下で推移していたが、49週から急増し第52週(12月22日から12月28日)にピークに達した。

調査期間中、感染性胃腸炎と診断された患者26名より糞便を採取し病原因子を検索した結果、16名(61.5%)からNV遺伝子が検出され、この期間に流行が認められた感染

性胃腸炎の主な病原物質はNVであることが確認された(図-2)。

#### 2) 各種検体から検出されたNV遺伝子数

##### ①感染性胃腸炎患者便

感染性胃腸炎患者便26件を対象に定量PCR法によるNV遺伝子の検出検査を行った結果、陽性便1gに含まれるNV遺伝子数は、最も少ない検体で $1.9 \times 10^2$  copyで最大値は $4.3 \times 10^7$  copyで平均 $5.5 \times 10^6$  copyであった。なお、検出されたNVの遺伝子型はすべてGII型であった。

##### ②流入水・放流水、河川水から検出されたNVの遺伝子数

河川水からは12月25日以降毎回NV遺伝子が確認された。検出されたNV遺伝子はすべてGII型であった。NVが検出された検体の1L中の遺伝子数は、最大で521.7 copy、最小で126.1 copyであった。(図-3) 流入水および放流水からは調査期間中毎

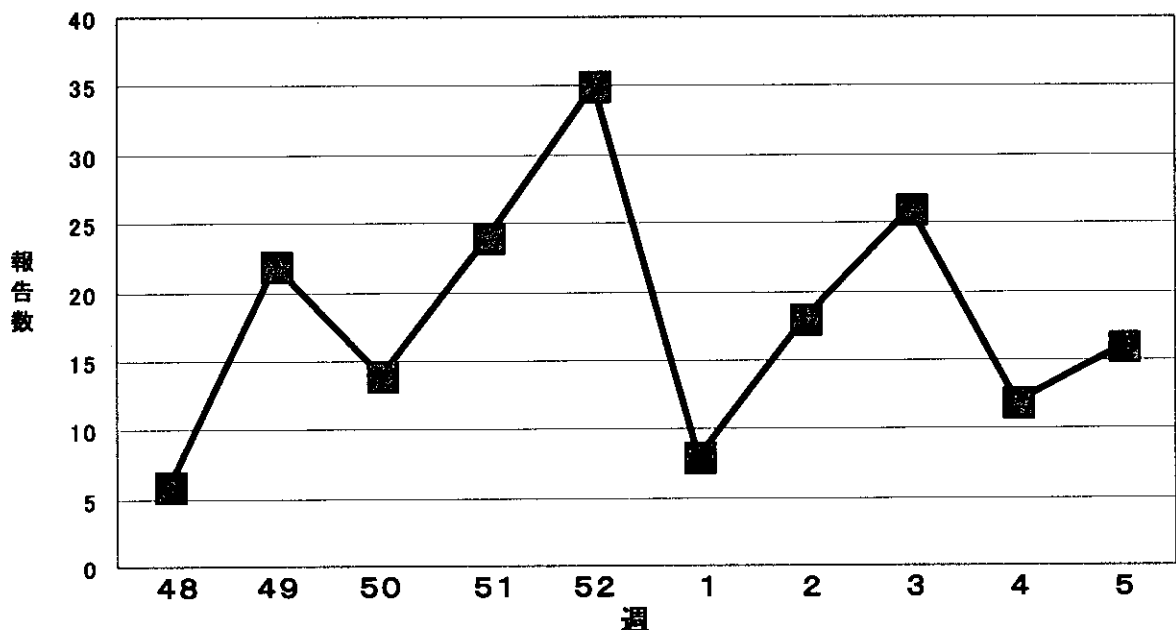


図-2 A地区における感染性胃腸炎患者報告数(人)

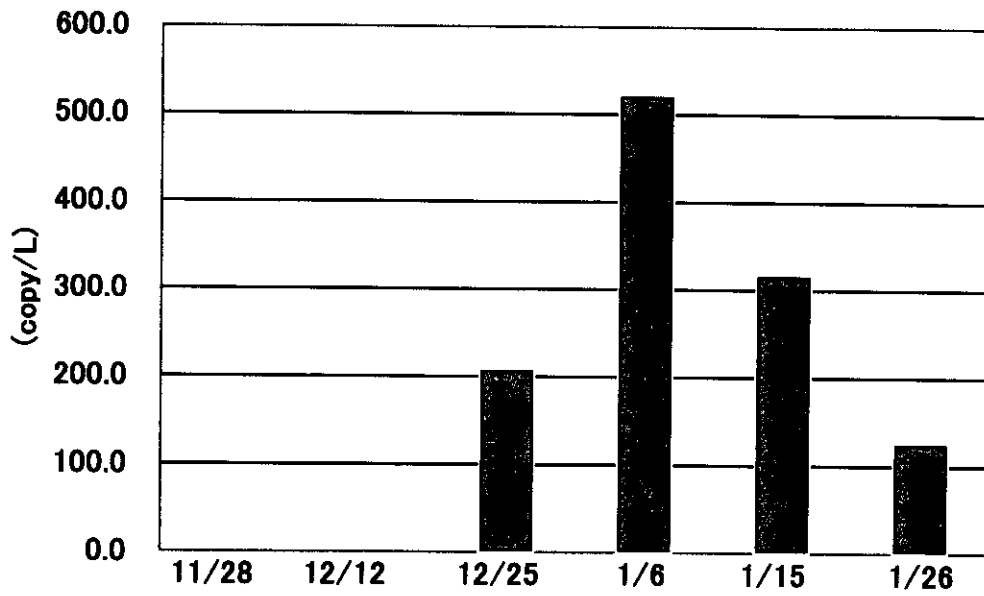


図-3 河川水中のNV遺伝子数の推移

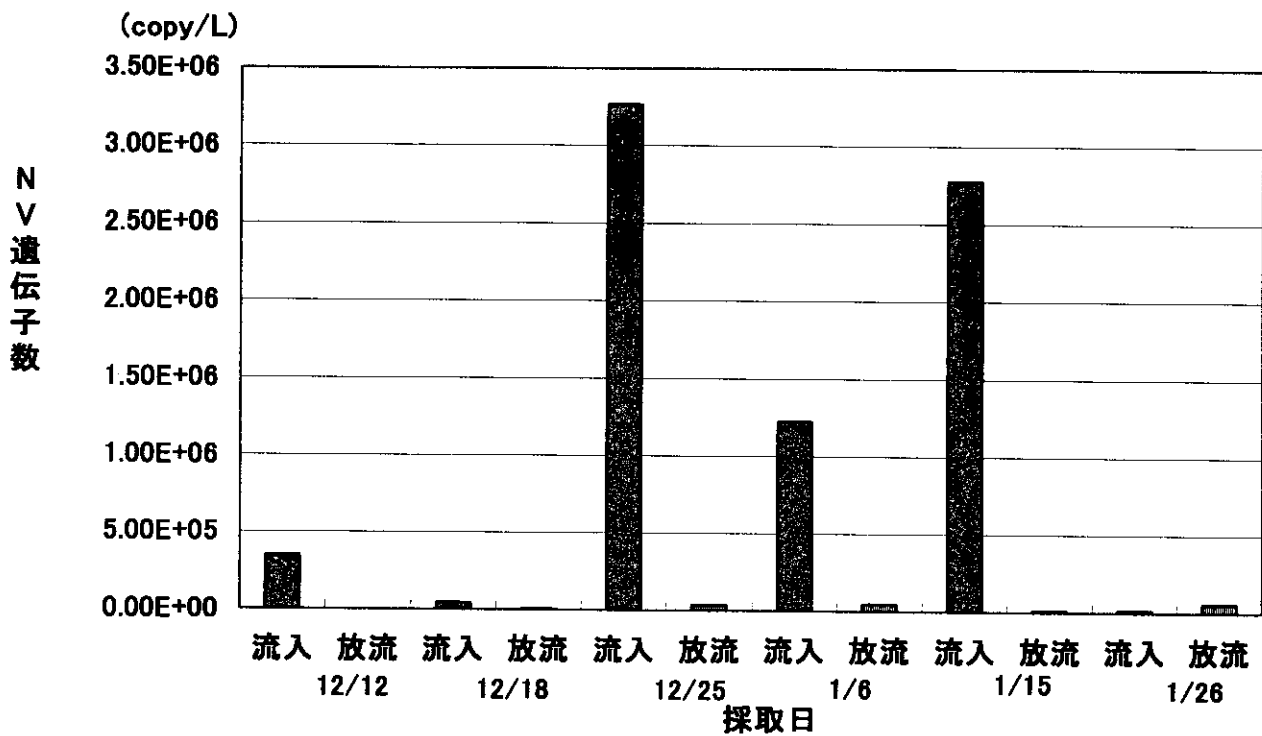


図-4 下水処理場流入水および放流水中のNV遺伝子数の推移



図-5 NV遺伝子のcapsid領域の塩基配列に基づく系統解析結果 (NJ法)

回 NV 遺伝子が確認された。12月25日、1月6、15日の流入・放流水、1月26日の放流水からはGⅠおよびGⅡ両型のNVが検出された。それ以外に検出されたNVの遺伝子型はすべてGⅡ型であった。流入水1L中のNV遺伝子数の最大値は12月25日に検出された $3.3 \times 10^6$  copyであった。同様に放流水1L中では1月26日の検体から検出された $5.9 \times 10^4$  copyが最大値であった。(図-4)

### ③カキから検出されたNV遺伝子数

超遠心法でカキからNVを濃縮し定量した結果、すべて実測値で10copy未満であった。

なお、今回最も高い値が確認された検体は2003年12月25日に採取し破砕法による濃縮を行ったカキで、定量値は4.2copy/gであった。

### 3) 養殖カキのNV汚染経路の推定

感染性胃腸炎患者、流入水・放流水、河川水、養殖カキから検出された一部のNV遺伝子について解析を行った結果、12株が

参照株のLordsdaleに近縁株(>91%)であった。同一の遺伝子型であるこれらの株は12月5日に採取した感染性胃腸炎患者便から検出後、約1ヶ月間にわたり放流水を除く各種検体から検出された。このことにより汚染経路の一つとして感染性胃腸炎患者、下水、河川、カキという経路が強く示唆された。(図-5)

### 4) カキからのウイルス濃縮法の検討

細胞破砕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砕法が高かった。破砕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NV濃縮法として有用と考えられた。

### 5) 下水処理場でのNVの除去効果

流入水と放流水中に含まれるNV遺伝子を定量し、下水処理場でのNVの除去効果を調査した結果、1.2logから2.6logの除去が確認された。なお、今回調査を行った下水処理場は流入から放流までの処理時間が通常の状態では約30時間であり、除去

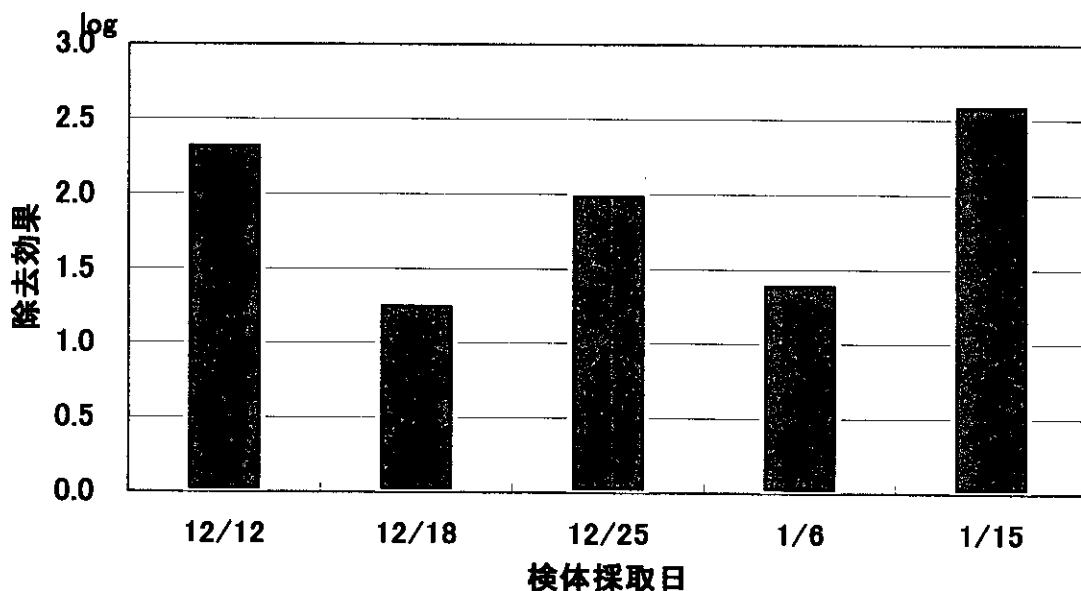


図-6 下水処理場でのNVの除去状況



表-1 実測値が10コピー未満でNV陽性例

No	検体の種類	定量PCR実測値		RT-PCR	
		G1	G2	1st PCR	2nd PCR
1	胃腸炎患者便	0	1.8	-	G2+
2	カキ	0	4.2	-	G2+
3	カキ	0	1.1	-	G2+
4	カキ	0	1.1	-	G2+
5	カキ	0	1.3	-	G2+

効果を確認するためには時間差を考慮する必要があると考えられた。しかし、12月25日、1月6日、15日の調査結果では流入水のNV定量値に大きな変化が確認されなかったことから考慮しなかった。(図-6)

#### 6) NV陰性値(<10 copy)についての検討

今回の調査において、NV定量値(実測値)が10copy未満のNV陰性を示した検体5件(患者便1件、カキ4件)から抽出したRNAを用いて(同じcDNAを用いて定量、定性PCRを行った)、RT-PCR法を実施した。その結果、すべての検体についてnested-PCRでNV遺伝子の増幅産物が確認された。増幅産物の塩基配列決定後BLAST searchで検索した結果、すべてNV遺伝子であることが確認された。定量PCRにおいて実測値が10copy未満の場合データの再現性は低いが、陰性と判断することはさらに検討が必要と考えられた。(表-1)

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

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、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

##### 2. 学会発表

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

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）

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：H15 年度のウイルス性食中毒様集団発生事例について

分担研究者	静岡県環境衛生科学研究所	杉枝 正明
	神奈川県衛生研究所	古屋 由美子
	大阪市立環境科学研究所	青木 孝祐、入谷 展弘
	愛媛県立衛生環境研究所	大瀬戸 光明
	三重県科学技術振興センター	荒川（西） 香南子
	鹿児島県環境保健センター	新川 奈緒美
	群馬県衛生環境研究所	木村 博一
研究協力者	山口県環境保健研究センター	西田 知子
	北海道立衛生研究所	吉澄 志磨
	青森県環境保健研究センター	三上 稔之、筒井 理華、石川 和子
	埼玉県衛生研究所	篠原 美千代、瀬川 由加里、 内田 和江、島田 慎一、土井 りえ
	長野県衛生公害研究所	徳竹 由美
	広島県保健環境センター	福田 伸治
	鳥取県衛生研究所	川本 歩
	佐賀県衛生薬業センター	安藤 克幸
	横浜市衛生研究所	宇宿 秀三
	千葉市環境保健研究所	田中 俊光
	宮城県保健環境センター	植木 洋
	国立感染症研究所	加藤 由美子、阿部 陽子、齋藤 利江 愛木 智香子、秋山 美穂 山下 和予、岡部 信彦
主任研究者	国立感染症研究所	西尾 治

研究要旨

平成 15 年度に発生したカキ関連ウイルス性食中毒 22 事例について調査した結果、発生は 11 月から 5 月までみられ、12 月の発生が 9 事例と最も多かったが、例年に比べ発生件数は極めて少ない発生であった。食品取扱者事例は、12 月～1 月に多く発生し、全体の 55% を占めていた。また 100 名を超える大規模なものも 3 事例発生した。事例毎の複数の患者から検出されたノロウイルス（NV）の遺伝子型は、カキ事例は遺伝子型が複数検出されて

いたが、食品取扱者事例は殆どが単一であった。更に、患者と食品取扱者から検出された遺伝子型が同一であった事例も確認され、食品取扱者由来であったことが裏付けられ、食品取扱者の健康管理と衛生教育の必要性が改めて認識された。また、カキの生食は体調の悪い日と、高齢者、乳幼児は避けることが望ましい。また、食品取扱者事例で多く検出された C-9、C-10、C-20 は乳幼児下痢症患者から検出されている株であり、食品取扱者事例と乳幼児下痢症との間に因果関係が成立していることが示された。

#### A.研究目的

ウイルス性食中毒様集団発生に関し、その原因食材、発生状況等の疫学的、ウイルス学的解析を行い、今後の食中毒発生に対する防止対策を構築することを目的とした。

#### B.調査対象

平成 15 年度に発生したウイルス性食中毒様集団発生事例のうち、カキ関連食中毒事例 22 事例、食品取扱者事例 104 事例について調査した。

ウイルス学的検査は、カキ事例は、患者ふん便 137 件、食品取扱者ふん便 51 件について、食品取扱者事例は、患者ふん便 685 件、食品取扱者ふん便 516 件、吐物 31 件、食品 197 件について実施した。

#### C.検査方法

検体は PBS を加え 10%乳剤とし、10,000rpm20min 遠心後の上清を超遠心法またはポリエチレングリコールによる濃縮方法にて濃縮し、RNA 抽出に用いた。RNA 抽出は QIAamp Viral RNA Mini キット(QIAGEN)を用い、抽出 RNA は DNase I 処理後、random hexamer (Amersham Pharmacia) を用いて Super Script II RT(Invitrogen)で逆転写し、cDNA を合成した。この cDNA を用いて、リアルタイム PCR 法および RT-PCR 法で NV の検出を行った。リアルタイム PCR 法のプ

ライマーは G1 では COG1F/COG1R、G2 では COG2F/COG2R を用い、プローブは Taq Man プローブ (ABI) で G1 は RING1-TP(a) と RING1-TP(b)、G2 は RING2AL-TP を用いた。RT-PCR 法はカプシド領域のプライマーを用いて行った。RT-PCR 法で増幅された PCR 産物はダイターミネーター法でダイレクトシーケンスを行い、塩基配列を決定した。

#### D.結果

平成 15 年度に発生したカキ事例 22 件と食品取扱事例 104 件とに分けて調査した。

食中毒の月別発生状況は図 1 に示した様に、カキ事例は 12 月から 1 月に発生した。食品取扱者事例は、11 月からやや多くなり、12 月から 1 月がピークで、その後 5 月まで発生が認められた。

原因施設別発生状況は、カキ事例(図 2) は 85%が飲食店での発生であった。食品取扱者事例は、飲食店事例・旅館が半数とカキ事例に比べ少なく、事業所(老人ホーム、福祉施設等)が 19%、学校が 8%に見られた。

事例当たりの患者数(図 4)では、カキ事例は、10 人未満が全体の 60%を占め、最も多く、次いで 10 人～20 人未満が 5 件(23%)、20 人～50 人未満が 4 件(18%)で、患者数 50 人以上の事例はなかった。喫食者数 608 名中うち 259 名が発症(43%)した。食品取扱者事例は、50 人未満が 102 件(85%)、

50人以上が18件(15%)であった。喫食者数8940名中2665名が発症(27%)した。

ウイルス検査は、カキ事例では患者ふん便137件中90件(66%)から、食品取扱者ふん便は51件中5件(10%)からNVが検出された。カキ事例の12件について遺伝子型を調べた結果、事例の複数の患者から検出された遺伝子型が1種類の事例は5件(42%)、2種類は3件(25%)、3種類は2件(17%)、4種類と5種類はそれぞれ1件(8%)であった。多く検出されたGenotypeは、C-9の7件であった。

食品取扱者事例は、患者ふん便は685件中497件(73%)からNVが検出された。食品取扱者ふん便は、516件中83件(16%)、吐物は、13件中9件(69%)、食品は197件中3件(2%)からNVが見出された。36事例について遺伝子型を調査した結果、事例の複数の患者から検出された遺伝子型が1種類であったのは28件(77%)、2種類は6件(17%)、3種類は2件(6%)であった。多く検出された遺伝子型は、C-9類似株が14件、C-10が10件、C-20が4件であった。

図1：月別食中毒発生状況

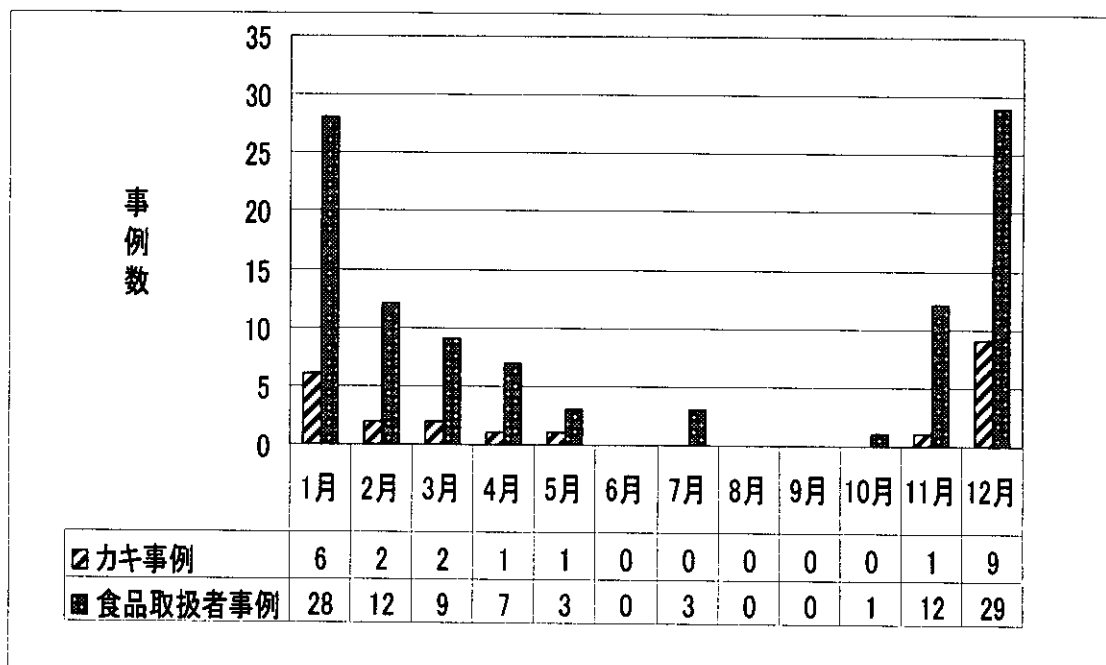


図 2：カキ事例の原因施設別発生状況

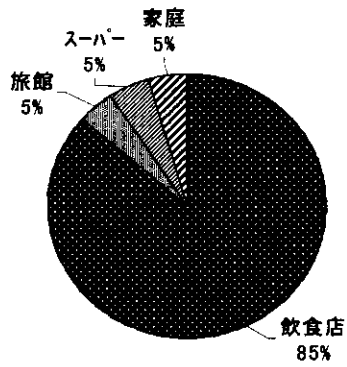


図 3：食品取扱者事例の原因施設別発生状況

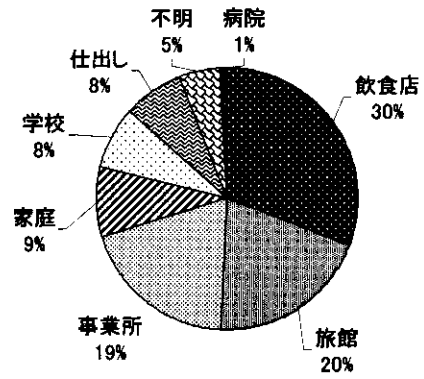


図 4：ノロウイルス患者数分布

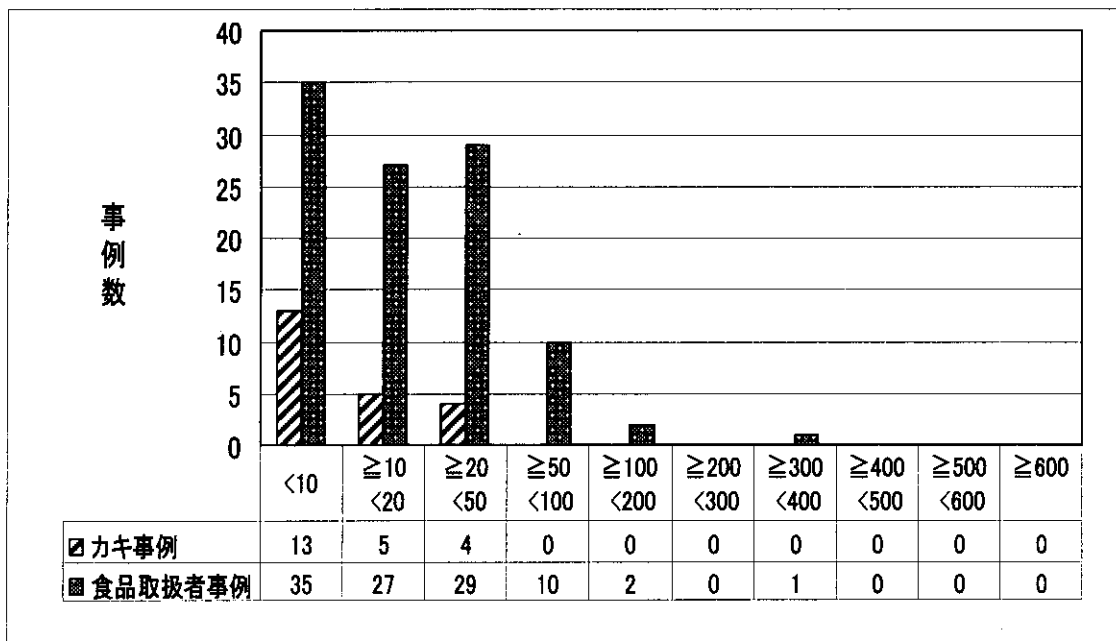


図 5 : カキ事例 1 件当たりの遺伝子型の種類別発生状況

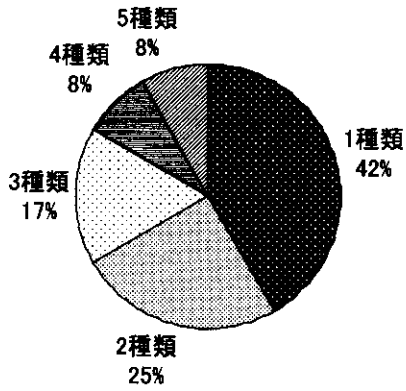


図 6 : 食品取扱者事例 1 件当たりの遺伝子型の種類別発生状況

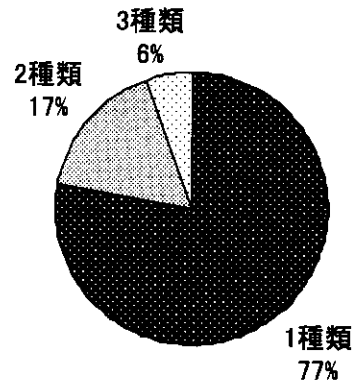
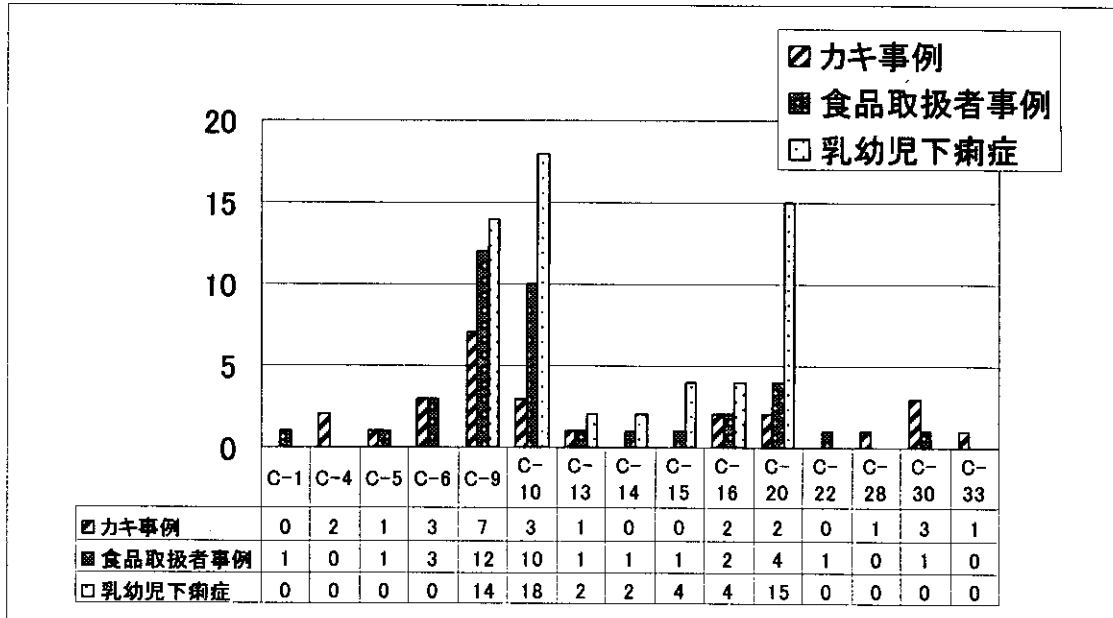


図 7 : 遺伝子型別発生状況



## E. 考察およびまとめ

過去 2 年間はカキ事例と食品取扱者事例がほぼ同数であったが今年度は、例年に比べカキ事例の発生が食品取扱者事例の 1/5 程度と極端に少なかった。それでもカキ事例は 12 月から 1 月にかけて発生したが、この時期はカキが NV に汚染されており、汚染されたカキをヒトが喫食することにより発生しているが、今年度はこの時期のカキの NV 汚染率・量共に例年よりは低かった。

食品取扱者事例 104 事例では、10 月から発生しその後増加し、12 月・1 月が発生のピークとなっていたが、この時期はノロウイルスによる乳幼児の散発あるいは流行性胃腸炎の発生時期であり、乳幼児からのウイルスに汚染された便に汚染される、あるいは食品取扱者が感染し食品取扱者を介して食品を汚染し、その結果、食中毒事例が発生していると推察される。原因施設は、カキ事例ではそのほとんどが飲食店での発生で、食品取扱者事例は飲食店、旅館、事業所での発生が多いというのが特徴であった。従って、これらの施設の食品取扱者における衛生教育、衛生管理の徹底が、食中毒発生件数の防止に極めて重要である。発生規模は、カキ事例では 1 事例当たりの患者数は 20 人未満が殆どであるのに対し、食品取扱者事例では 50 人を超えることが多く、カキ事例に比べ大規模になるという傾向がある。このことはヒトのふん便中に排泄されるウイルス量は膨大で殆どの患者では 1 億個／ふん便 1g であり、一方、感染力は非常に強く、僅か 100 個以下で発病させるといわれていることから、患者のふん便

がたとえほんの僅かでも付着すれば大規模となりうることも当然であると推察される。検出された遺伝子型は、カキ事例では 1 事例において多種類であることが多い。カキの汚染の様式は不特定多数の人から排泄された NV が浄化槽、河川そして海水を汚染し、それがカキの中腸線で蓄積されることにより、カキ事例では同一事例の患者であっても、検出される遺伝子型は患者によって異なることが多い。ヒトでは、複数の NV 遺伝子型に汚染されたカキを喫食し、そのヒトで最も増殖しやすいウイルスを増殖し感染、そしてまた排泄する。それに対し、食品取扱者事例は、複数の患者から検出される遺伝子型は殆どが単一である。この理由は NV の汚染源が特定のヒトからであり、本研究でも、患者と食品取扱者の遺伝子型が一致するなど、食品取扱者由来の事例が確認されている。

検出された Genotype は、カキ事例では C-9 が多く検出され、カキが C-9 に汚染されている可能性が高いことが推察される。食品取扱者事例では、C-9、C-10、C-20 が多く検出され、乳幼児下痢症患者からも同株の検出が多いことから、食品取扱者事例と乳幼児下痢症は、強い関連性が示唆された。

カキはできる限り加熱して食することが食中毒発生防止に重要である。また、食品取扱者事例の防止対策としては、主な原因施設である飲食店、事業所、旅館、学校などの衛生管理の強化、食品取扱者の衛生教育等が必要と考えられる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

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

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

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)

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

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

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

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

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、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

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

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

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年度に大阪府で検出された 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

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 のプローブ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ーウォーク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

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、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

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）  
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 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

分担研究者	愛媛県立衛生環境研究所	大瀬戸 光明
	神奈川県衛生研究所	古屋 由美子
	大阪市立環境科学研究所	春木 孝祐
	三重県科学技術振興センター	荒川(西) 香南子
	鹿児島県環境保健センター	新川 奈緒美
研究協力者	長野県衛生公害研究所	徳竹 由美
	埼玉県衛生研究所	篠原 美千代、瀬川 由加里、 内田 和江、島田 慎一、土井 りえ
	神奈川県衛生研究所	原 みゆき、片山 丘
	愛媛県立衛生環境研究所	近藤 玲子、山下 育孝、 吉田 紀美、豊嶋千俊
	大阪市立環境科学研究所	入谷 展弘
	大阪市立大学大学院	勢戸 祥介
	宮城県保健環境センター	植木 洋、山木 紀彦、渡邊 節、 沖村 容子、秋山 和夫
	国立感染症研究所	秋山 美穂、愛木 智香子、阿部 陽子
主任研究者	国立感染症研究所	西尾 治

## 研究要旨

ノロウイルス(NV)による食中毒事例の大きな要因のひとつとして食品取扱者を介した食品汚染が示唆されている。ふん便および吐物中の NV 量をリアルタイム PCR 法で定量したところ、多くの患者ふん便 1g 中には 100 万個以上の NV が存在し、吐物は患者ふん便より若干少ないものの多量に NV が存在しており、これらは極微量が食品に付着しても多くのヒトを発症させる感染源になると考えられ、食品取扱者は料理を作る前には徹底的に手を洗い、プラスチック手袋をして、直接食品に触れないことが食中毒防止に重要であると考えられた。

### A. 研究目的

NV による食中毒事例において、近年、カキを介さない大規模な事例が多発している。これらの事例は、NV に感染した食品取扱者のふん便が食品を汚染することにより発生していると推測されている。また、NV に感染したヒトのふん便および吐物が環境を汚染することにより起こるヒト-ヒト感染や空気感染による NV 集団発生も発生している。

NV 感染患者ふん便および吐物、食品取扱者ふん便中に含まれる NV 量を定量し、ふ

ん便および吐物の感染源の意義について考察した。

### B. 研究方法

平成 14 年 4 月～平成 16 年 3 月の間に NV が検出された胃腸炎事例 171 事例の NV 感染患者便 775 件および吐物 20 件、食品取扱者便 97 件を用いた。

NV 検査は本研究班で統一された検査法で行った。検査材料は 10%乳剤にし、QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いてウイルス RNA を抽出した。抽出 RNA からの

cDNA 合成は Superscript II (Invitrogen) を用いた。RT-PCR 法の NV 検出プライマーは、genogroup1 (G1) では COG1F/G1SKR、genogroup2 (G2) では COG2F/G2SKR および ALPF/G2ALSKR を用いた。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。NV の定量はリアルタイム PCR 法で行い、G1 はプライマー：COG1F/COG1R、プローブ：RING1-TP(a)、RING1-TP(b)、G2 はプライマー：COG2F、ALPF/COG2R、プローブ：RING2AL-TP を用いた。リアルタイム PCR による NV 定量値 (コピー数) は、ふん便および吐物 1g 当たりのコピー数で示した。

### C. 研究成績

胃腸炎事例の NV 感染患者ふん便 775 件および患者吐物 20 件、食品取扱者ふん便 97 件について NV 量を定量した。G1 と G2 が同一検査材料から検出されたときにはそのコピー数を合計し、表 1 にはコピー数の分布を示し、図 1 には百分率でコピー数

の分布を示した。

患者ふん便 775 件のふん便中の NV 量は  $10^6$  コピー以上認められたものが 92%(713 件)あり、 $10^8$  コピーが 217 件(28%)と最も多く、 $10^{11}$  コピー以上も 23 件(3%)認められた。

患者吐物 20 件の吐物中の NV 量は、 $10^4$  コピー以上が 19 件(95%)認められ、 $10^5$  コピーが 6 件(30%)と最も多かった。

食品取扱者ふん便 97 件のふん便では、 $10^6$  コピー以上が 81 件(84%)で、 $10^7$  コピーが 22 件(23%)と  $10^9$  コピーが 23 件(24%)で多かった。

食品取扱者で発症者・非発症者別の NV 排泄量を 10 事例の発症者 12 件、非発症者 10 件について調査し表 2 に示した。発症者のふん便 1g 中からは  $10^7$  コピー以上が 11 件(92%)見られ、 $10^7$  コピーが 4 件(33%)と最も多く検出された。

非発症者のふん便 1g 中からは  $10^7$  コピー以上が 8 件(80%)で、 $10^7$  コピーおよび  $10^8$  コピーがそれぞれ 3 件(30%)と多く検出された。

表 1 検査材料 1g あたりの NV コピー数

		検査数	コピー数/g (log10)								
			$\geq 0$   <4	$\geq 4$   <5	$\geq 5$   <6	$\geq 6$   <7	$\geq 7$   <8	$\geq 8$   <9	$\geq 9$   <10	$\geq 10$   <11	$\geq 11$
患者	ふん便	775	4	24	34	83	138	217	173	79	23
	吐物	20	1	3	6	4	3	1	1	1	0
食品取扱者	ふん便	97	4	3	9	10	22	15	23	9	2

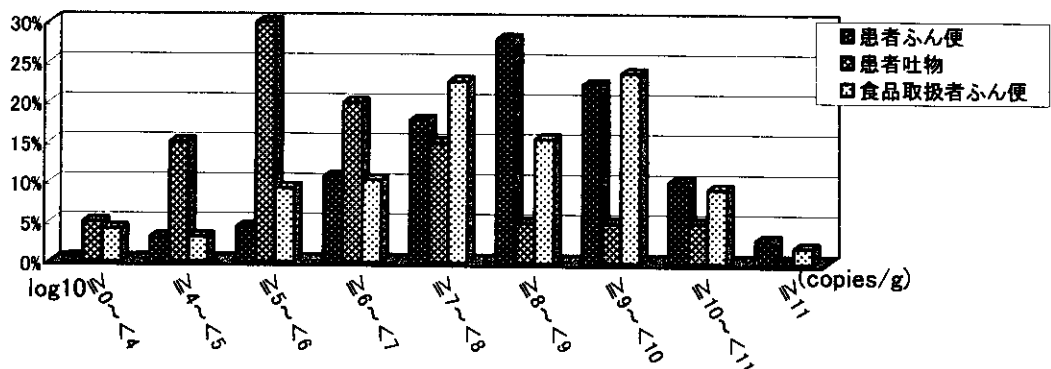


図 1 検査材料 1g あたりの NV コピー数分布 (百分率)