

表2 食品取扱者における発症者・非発症者別の
ふん便 1g あたりの NV コピー数

	検査数	コピー数/g (log10)					
		≥6 <7	≥7 <8	≥8 <9	≥9 <10	≥10 <11	≥11
発症者	12	1	4	1	3	2	1
非発症者	10	2	3	3	0	2	0

検出された NV 量を genogroup 別 (G1、G2) に表 3 に示した。

患者ふん便 775 件について、G1 ではリアルタイム PCR 法で 152 件 (20%) から G1 が検出された。検出された 152 件のふん便では 10^7 コピーが 28 件 (18%) と最も多く、 10^4 コピー未満は 21 件 (14%) あった。G2 では 712 件 (92%) から検出された。 10^6 コピー以上が 651 件 (91%) 見られ、 10^8 コピーが 202 件 (28%) と最も多かった。

吐物 20 件では G1 は 2 件 (10%) から検出され、吐物 1g 中に 1.7×10^7 コピー、 1.6×10^{10} コピーであった。G2 は 19 件 (95%) から

検出された。検出された 19 件は、 $2300 \sim 4.2 \times 10^9$ コピーの範囲で、 10^4 コピー以上が 17 件 (89%) 認められ、 10^5 コピーが 6 件 (32%) で最も多かった。

食品取扱者ふん便 97 件では、G1 は検出された 17 件のふん便中には $15 \sim 1.0 \times 10^9$ コピーの範囲で認められた。 10^6 コピー以上は 10 件 (59%) で、 10^7 コピーが 5 件 (29%) と最も多かった。G2 では 91 件 (94%) から検出された。検出された 91 件のふん便には 10^6 コピー以上は 82 件 (90%) 認められ、 10^9 コピーが 22 件 (24%) と最も多かった。

表3 検査材料 1g あたりの genogroup 別 NV コピー数

	検査数	group	リアルタイム PCR 不検出	コピー数/g (log10)									
				≥0 <4	≥4 <5	≥5 <6	≥6 <7	≥7 <8	≥8 <9	≥9 <10	≥10 <11	≥11	
患者	ふん便	775	G1	623	21	17	11	17	28	25	22	9	2
			G2	63	7	21	33	78	126	202	153	71	21
	吐物	20	G1	18	0	0	0	1	0	0	1	0	
			G2	1	2	3	6	4	2	1	1	0	0
食品取扱者	ふん便	97	G1	80	2	3	2	3	5	1	1	0	0
			G2	6	5	4	8	9	18	14	22	9	2

前述の検査材料の中で遺伝子型が決定できた NV 感染患者ふん便 425 件および患者吐物 9 件、食品取扱者ふん便 58 件について、遺伝子型別の NV 量を調査した。コピー数は、G1 と G2 が同一検査材料から検出されたときには、その合計を示した。

患者ふん便から検出された遺伝子型は、G1 のみの検出は、遺伝子型が 11 種類、検

出件数 44 件であった。G2 のみが遺伝子型が 11 種類、検出件数 359 件であった。G1 と G2 の混在は C-3 と C-10 (4 件)、C-3 と C-16 (1 件)、C-4 と C-16 (1 件)、C-5 と C-10 (2 件)、C-6 と C-9 (1 件)、C-6 と C-10 (1 件)、C-6 と C-13 (2 件)、C-6 と C-16 (3 件)、C-8 と C-28 (1 件)、C-9 と C-30 (1 件)、C-10 と C-30 (1 件)、C-16 と C-21 (1 件)、C-16

と C-30 (2 件)、C-18 と C-30 (1 件) で、14 種類の組み合わせであり、検出件数 22 件であった。1~4 件検出された遺伝子型では全て、ふん便中に 10^6 コピー以上の NV が検出された。6 件以上検出された遺伝子型については、コピー数の分布を表 4 に示した。

患者吐物から検出された遺伝子型は、G1 が C-5 (2 件) のみで、G2 が C-9 (5 件)、C-10 (1 件)、C-15 (1 件) で、遺伝子型が 3 種類、検出件数 7 件であった。全て患者ふん便からも検出された遺伝子型であり、吐物中には 10^5 コピー以上の NV が検出された。

食品取扱者ふん便から検出された遺伝子

型は、G1 のみの検出は遺伝子型が 3 種類、検出件数 6 件であった。G2 のみが遺伝子型が 9 種類、検出件数 51 件であった。G1 と G2 の混在は、C-6 と C-11 (1 件) のみであった。全ての遺伝子型でふん便 1g 中に 10^6 コピー以上の NV が検出された。

表 4 に示した患者ふん便から検出された遺伝子型について、患者吐物および食品取扱者ふん便においても検出されたものを表 4 に示した。

患者ふん便、食品取扱者ふん便ともに、 10^7 コピーから 10^{10} コピーの間がいずれも半数以上を示した。吐物はふん便より NV が少ない傾向が見られた。

表 4 検査材料 1g あたりの遺伝子型別 NV コピー数

group	type	検査数	コピー数/g (log10)									
			≥0 <4	≥4 <5	≥5 <6	≥6 <7	≥7 <8	≥8 <9	≥9 <10	≥10 <11	≥11	
G1	C-3	患者ふん便	8	0	0	1	0	2	3	0	2	0
	C-4	患者ふん便	6	0	0	0	1	4	0	1	0	0
		食品取扱者ふん便	3	0	0	0	0	1	1	1	0	0
	C-6	患者ふん便	15	0	0	0	0	3	4	5	3	0
G2	C-9	患者ふん便	165	2	1	4	17	25	47	43	22	4
		患者吐物	5	0	0	1	2	1	0	1	0	0
		食品取扱者ふん便	28	1	0	2	3	5	6	7	4	0
	C-10	患者ふん便	66	0	2	1	4	8	22	16	12	1
		患者吐物	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
		食品取扱者ふん便	6	0	0	0	2	0	2	1	1	0
	C-11	患者ふん便	6	0	0	0	2	2	1	0	1	0
	C-13	患者ふん便	6	0	0	0	0	0	3	3	0	0
		食品取扱者ふん便	4	0	0	0	0	1	1	0	1	1
	C-14	患者ふん便	11	0	0	0	2	2	4	2	0	1
	C-15	患者ふん便	27	0	0	1	3	5	7	4	4	3
		患者吐物	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
		食品取扱者ふん便	3	0	0	0	0	1	0	2	0	0
	C-16	患者ふん便	25	0	1	0	3	6	6	5	3	1
		食品取扱者ふん便	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	C-20	患者ふん便	39	0	0	2	6	9	7	13	1	1
食品取扱者ふん便		4	0	0	0	0	0	2	2	0	0	
C-31	患者ふん便	8	0	1	0	0	3	2	1	1	0	
	食品取扱者ふん便	2	0	0	0	0	1	0	1	0	0	

D. 研究考察

NV 感染患者のふん便中の NV 量を定量したところ、92%にふん便中に 100 万 (10⁶) コピー以上存在した。

NV 感染患者吐物に排泄される NV 量は、ふん便に比べ 1/100 ほど低い傾向が見られたものの、それでも多い量であった。

食品取扱者ふん便は、患者ふん便に比べると若干少ない傾向が見られたが、ふん便中に 100 万コピー以上存在していたものは 84%であった。食品取扱者の発症者と非発症者のふん便中に排泄される NV 量を調査したところ、発症者の方が非発症者より、ふん便中に排泄された NV 量が若干多い傾向が見られた。しかし、非発症者においても多量の NV が排泄されていた。このことから、症状が無くてもウイルスを排泄することもあるので、食品取扱者は健康であっても、常にウイルスを排泄する危険性があることを自覚し、食品を取り扱うようにしなければならない。

NV は 100 個以下で感染し、発病させると言われている。今回の調査により、NV に汚染されたふん便および吐物が、極微量に付着するだけでも多くのヒトに感染し発病させる NV 量であることが示された。これらが食品取扱者を介し食品を汚染させる、汚染された手等で周りのものに接触することにより起きるヒト-ヒト感染、環境を汚染させた後、乾燥することによる空気感染の感染源となることが起こりうる。従って、NV に汚染されたふん便および吐物の処理を適切に行うことが重要である。食品を取り扱うときには、必ず徹底的に手を洗浄し、プラスチック手袋を着用し直接食品に触れないようにするなど、感染防止に努めることが必要である。

E. まとめ

NV が検出された患者ふん便および吐物、食品取扱者ふん便中には多量に NV が存在しており、NV 感染したふん便および吐物は、極微量でも感染源になると考えられた。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。

F. 研究発表

1. 発表論文

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

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

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

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

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一兵庫県、病原微生物検出情報、24：319-320、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

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

篠原美千代：SRSV の検査法、HACCP、9：30-33、2003

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

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

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

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

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

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、簗城昇次、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

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
ウォーク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

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、京都

徳竹由美、中村友香、横内文子、村松紘一、
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 平成 15 年度に検出されたノロウイルスの遺伝子型

主任研究者	国立感染症研究所	西尾 治
研究協力者	国立感染症研究所	加藤 由美子、愛木 智香子、 齋藤 利江、秋山 美穂
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	春木 孝祐
	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
研究協力者	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、石川 和子、小笠原 和彦
	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
	千葉市環境保健研究所	田中 俊光
	神奈川県衛生研究所	原 みゆき、片山 丘
	長野県衛生公害研究所	徳竹 由美
	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
	広島県保健環境センター	福田 伸治
	愛媛県立衛生環境研究所	近藤 玲子、山下 育孝、 豊嶋 千俊
	山口県環境保健研究センター	西田 知子

研究要旨

市販カキ、乳幼児下痢症患者便、食品媒介ウイルス性食中毒様集団発生により採取された検査材料から検出されたノロウイルス(NV)の遺伝子型を決定したところ、genotype2(G2)で多く検出された遺伝子型はいずれも乳幼児から多く検出されており、乳幼児の間で感染しているウイルスが食品を汚染していることが強く示唆された。

A. 研究目的

ノロウイルス(NV)の感染経路を明らかにすることを目的とし、市販カキ、乳幼児下痢症患者便、食品媒介ウイルス性食中毒様集団発生により採取された検査材料から検出されたNVの遺伝子型を決定し、分子疫学的解析を行った。

B. 研究方法

本研究班で統一されたNV検査によりRT-PCR法で陽性となったPCR産物について遺伝子配列が決定された、カキからの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 事例および食品取扱者ふん便 9 事例について検討した。NV の遺伝子型別は、NJ 法で解析を行い、カブシド領域の本研究班の分類 (C-1~C-38:別添 NV G1 系統樹、NV G2 系統樹) に従った。

C. 研究成績

カキ 62 件からは、G1 が 7 遺伝子型 (C-1, 2, 3, 6, 22, 30, 33)、G2 が 4 遺伝子型 (C-10, 15, 16, 20)、G1 と G2 の混在が 3 種類 (C-1, 10, 6, 15, 30, 10) 見出されており、G1 では C-30 が 9 件、G2 では C-15 が 14 件、C-10 が 10 件と多く、G1 と G2 が混在して検出されたものは各 1 件であった。

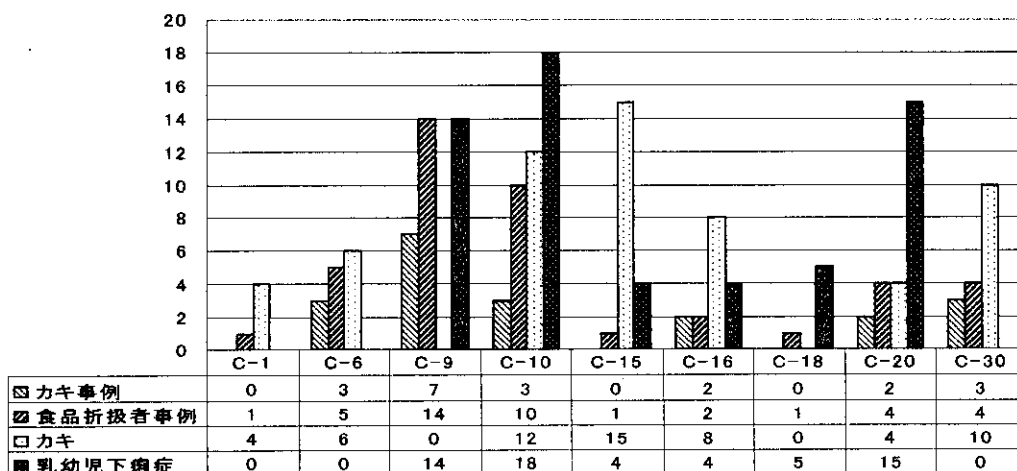
乳幼児下痢症患者のふん便 64 件からは、G2 が 8 遺伝子型 (C-9, 10, 13, 14, 15, 16, 18, 20) 見出され、C-10 が 18 事例と最も多く、次いで多く検出された型は、C-20 が 15 事例、C-9 が 14 事例であった。

カキ事例の患者ふん便 12 事例からは、G1 が 1 遺伝子型 (C-6)、G2 が 2 遺伝子型 (C-9, 20)、G1 遺伝子型の複数検出が 1 種類 (C-5・30)、G2 遺伝子型の複数検出が 2 種類 (C-9・10, C-9・16)、G1 と G2 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 4 事例で、C-6 および C-20、複数検出、混在してい

たものは全て各 1 事例であり、複数遺伝子型が検出されたもののうち 3 事例で C-9 が検出された。食品取扱者ふん便 1 事例は G1 と G2 の混在 (C-30・18) で、食品 1 事例は G1 と G2 の混在 (C-4・28) であった。

食品取扱者事例の患者ふん便 35 事例から G1 が 2 遺伝子型 (C-6, 30)、G2 が 4 遺伝子型 (C-9, 10, 14, 16)、G1 遺伝子型の複数検出が 2 種類 (C-1・22, C-6・30)、G2 遺伝子型の複数検出が 2 種類 (C-9・10, C-9・15)、G1 と G2 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 が 12 事例で最も多く、C-10 が 7 事例、C-6 が 2 事例で、C-14、C-16、C-30 は 1 事例から検出された。複数検出、混在は全て各 1 事例から検出され、そのうち 3 事例から C-30 が検出された。食品取扱者ふん便 9 事例からは、G1 が 1 遺伝子型 (C-6)、G2 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、G1 が 1 遺伝子型 (C-6)、G2 が 1 遺伝子型 (C-9) 見出された。

多く検出された遺伝子型を図 1 に示した。G2 で多く検出された遺伝子型はいずれも乳幼児から多く検出されていた。



[1 件 (事例) につき遺伝子型が複数検出されたものは、個々の遺伝子型として集計した]

図 1 食中毒事例、市販カキ、乳幼児下痢症患者便から検出された遺伝子型

D. 研究考察

C-10、C-20 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→食品取扱事例の経路が分子疫学的に明らかにされた。C-9 はカキからの検出は見られなかったが、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ており、恐らく上記 2 遺伝子型と同様な動向を示したものと推察された。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いない。この遺伝子型は乳幼児の下痢症患者から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。

以上のことから、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。

E. 研究発表

1. 論文発表

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 Environl Microbiol.* 69(10):5782-5786, 2003

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 - 大阪市一、病原微生物検出情報、22：317、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 - 大阪市一、病原微生物検出情報、23:64-65、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

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、叢城昇次、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

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

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

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

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

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

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

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：ノーウォーク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

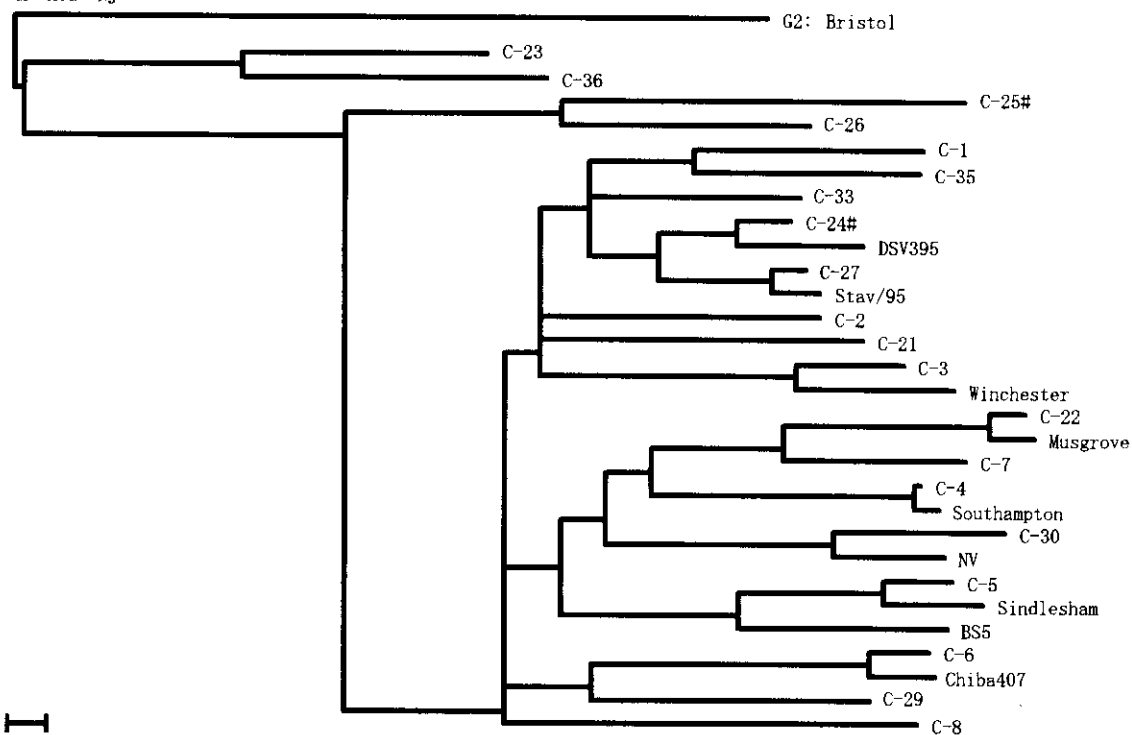
新川奈緒美、中山浩一郎、伊東祐治、西尾治：Norwalk virus による胃腸炎集団発生患者から排泄されるウイルス量と遺伝子型について、第 50 回日本ウイルス学会、2002 年、札幌

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

別添 (NJ法)

[GENETYX-MAC:Ver. 11]

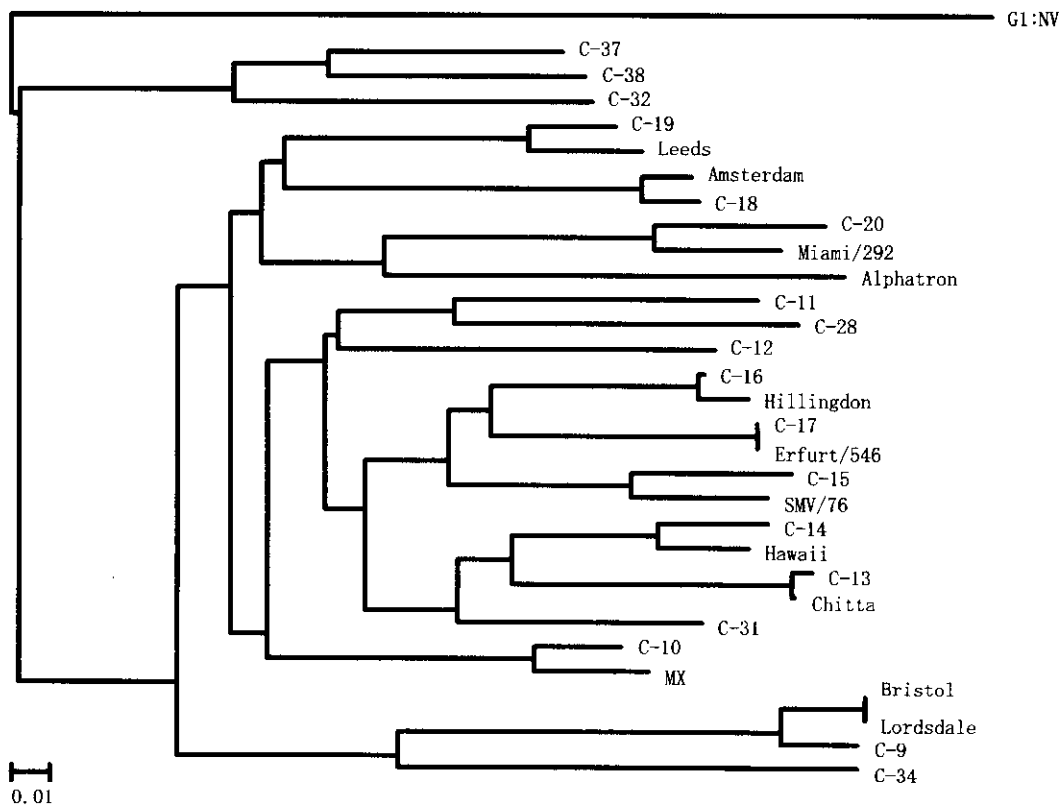
Method: NJ



NV G1 系統樹

[GENETYX-MAC:Ver. 11]

Method: NJ

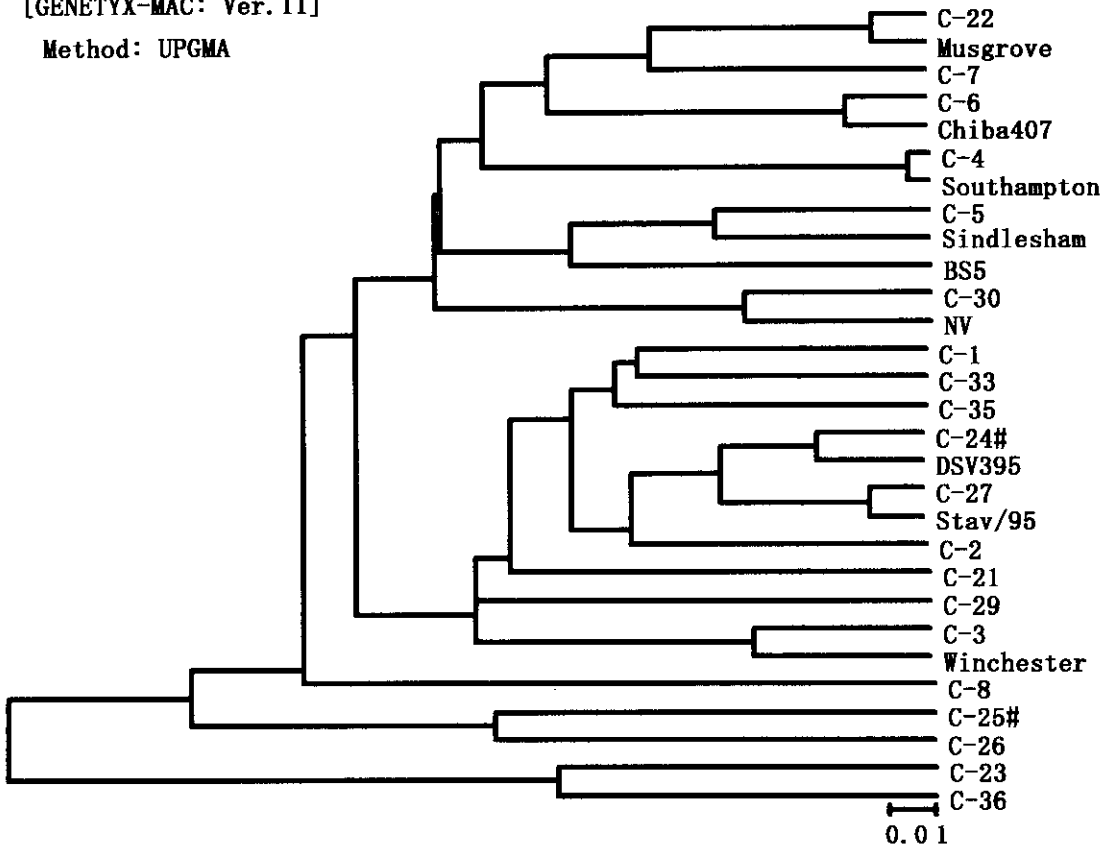


NV G2 系統樹

別添 (UPGMA 法)

[GENETYX-MAC: Ver. 11]

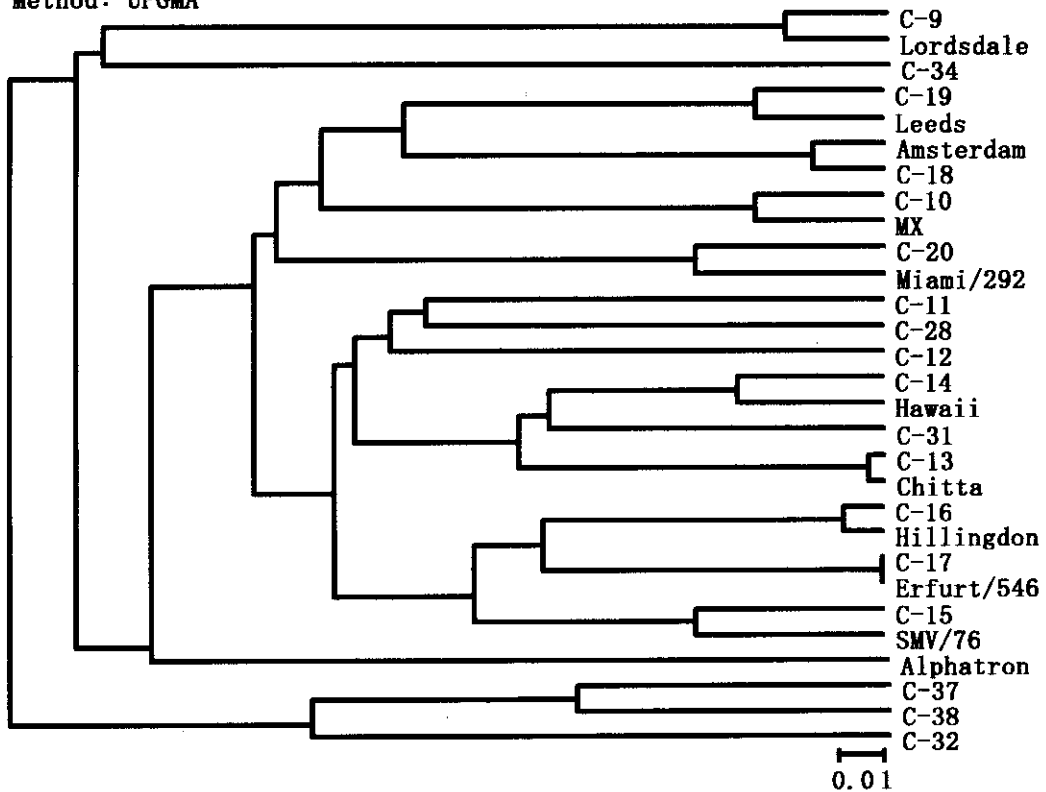
Method: UPGMA



NV G1 系統樹

[GENETYX-MAC: Ver. 11]

Method: UPGMA



NV G2 系統樹

平成 15 年度厚生労働科学研究補助金（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：ノロウイルス検査法の評価及び食品のノロウイルス汚染状況調査

研究協力者 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
主任研究者 国立感染症研究所 西尾 治

研究要旨

リアルタイム PCR を用いた食品のノロウイルス検査において、実測値 10 コピー未満の検査結果について検討した。カキ 1 個ずつの検査結果はばらつきが多いが、3 個を 1 ロットとして一つの結果として取り扱うと、80% の検体でリアルタイム PCR と 2nd リアルタイム PCR の結果は一致した。

リアルタイム PCR で 0 コピー以外の結果を陽性と判定すると、食中毒及び食中毒疑い事例の発生件数と、カキの陽性率の推移は類似していた。

A. 研究目的

平成 14 年度に引き続き、リアルタイム PCR の検査において、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。また、実際に市販されているカキについてノロウイルスの検査を実施した。

B. 研究方法

生カキは 1 つのロットにつき 3 個から 5 個をとり、1 つずつ個別に処理した。QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて RNA を抽出後、DNase 処理をし、random hexamer と Super Script II 逆転写

酵素 (Invitrogen) を用いて逆転写反応を行った。逆転写反応には抽出した RNA の全量を用いた。検査は最初にリアルタイム PCR により G1、G2 の遺伝子を定量的に検査した。

また、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、i) 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 PCR) と ii) 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 PCR、2nd PCR の 3 方法の結果について

検討を加えた。

C. 研究結果

1. リアルタイム PCR の結果、G1 は 106 検体、G2 は 183 検体が 2nd リアルタイム及び 2nd PCR の試験対象となった。同一ロットのカキすべてが、リアルタイム PCR で 0 コピーであった検体については検査の対象とはしなかった。

3 方法での結果をまとめて表 1 及び表 2 に示した。G1 については、リアルタイム PCR で 0 コピーであった 57 検体のうち、5 検体、9% が 2nd リアルタイム、2nd PCR で陽性であった。リアルタイム PCR で 0 より大きく 1 コピー未満の 16 検体では 6 検体 (38%) が 2nd リアルタイムで 7 検体 (44%) が 2nd PCR で陽性であった。1 コピーより大きく 10 コピー未満であった 31 検体では、2nd リアルタイムで 6 検体 (19%)、2nd PCR で 7 検体 (23%) が陽性となった。10 コピー以上の検体は 3 検体のみであったが、いずれも 2nd リアルタイム、2nd PCR では陽性であった。

同様に G2 についてみると、リアルタイム PCR で 0 コピーであった 71 検体うち、2nd リアルタイムで 11 検体 (15%)、2nd PCR で 3 検体 (4%) が陽性となった。0 より大きく 1 コピー未満の 60 検体ではそれぞれ 27 検体 (45%)、20 検体 (33%) が陽性、1 コピー以上 10 コピー未満の 55 検体では 37 検体 (67%)、28 検体 (51%) が陽性であった。G2 では 10 コピー以上の検体はなかった。

2. リアルタイム PCR の再現性の検討結果を表 3 に示した。1 つの海域から取れたカキ 10 検体について、リアルタイム PCR

で G1 は 2 回、G2 は 3 回測定した結果である。また、2nd リアルタイムは G1、G2 とも 2 回実施した。G1 では、リアルタイム PCR の測定結果が少なくとも 1 回は 0 コピーではなかった 5 検体のうち、2nd リアルタイムで陽性となったのは 1 回目の検査で 1 検体、2 回目の検査で 1 検体であり、この 2 検体は異なる検体であった。G2 ではリアルタイム PCR の測定結果が 3 回ともすべて 0 コピーではなかった 4 検体のうち 2nd リアルタイムで陽性となったのは 3 検体で、1 検体は 2 回実施した 2nd リアルタイムでも 2nd PCR でも陰性であった。3 回測定のうち 1 回は 0 コピーとなった検体は 5 検体であり、このうちの 1 検体だけが 2nd リアルタイムで陽性であった。2nd リアルタイムが陰性で、2nd PCR のみが陽性となった検体はなかった。

3. 表 4 に 3~5 検体を 1 ロットとし、G1、G2 の区別なく一括して判定した結果を示した。46 ロットについて集計したところ、リアルタイム PCR が陽性の 34 ロット中 28 ロット、(82%) 及びリアルタイム PCR 陰性の 12 ロット中 9 ロット (75%) でリアルタイム PCR と 2nd リアルタイムの結果が一致した。全体では、80% の検体でリアルタイム PCR と 2nd リアルタイムの結果は一致していた。なお、2nd PCR だけが陽性で 2nd リアルタイムが陰性という検体はなかった。

4. 平成 14 年度に検査を実施した中で、食中毒と関連している生カキが 2 事例分得られた。そのうちの 1 件について表 5 に検査結果を示した。G1 についてはすべてのカキで 2 回のリアルタイム PCR の結果が陰性であったので、G2 についてのみ示し

た。これらのカキはすべて同一湾内のカキであり、S1 から S6 は事件で喫食されたカキの生産日の 2 日前、S7 から S13 は翌日のカキである。実際に喫食したカキの残品はなく、その前後のカキの検査結果である。事件前のカキの 2 ロットのうち、1 ロット (S1~S3) は 3 検体中 1 検体が 1 回だけリアルタイム PCR で 0.34 コピーという数値になったが、2nd リアルタイム、2nd PCR では不検出であった。もう 1 ロット (S4~S6) についても 3 検体中 1 検体だけが 1 回のみリアルタイム PCR で 0.56 コピーとなり、2nd リアルタイムでは 2 検体が陽性であった。これに対し事件後のカキでは、7 検体中 4 検体がリアルタイム PCR で 2 回とも 0 コピー以外であり、2 検体は 1 回だけ 0 コピー以外の数値となった。2nd リアルタイムでは 7 検体中 5 検体、2nd PCR では 4 検体が陽性となり、ノロウイルス遺伝子の存在が確認された。

5. 2001 年 11 月~2004 年 2 月の市販生カキのノロウイルス遺伝子陽性率とカキの喫食があった食中毒の発生件数の推移を図 1 に示した。生カキのリアルタイム PCR 結果の判定は、前述の検討をふまえ、0 コピー以外は陽性とした。生カキにおけるノロウイルス遺伝子の検出率は 2002 年、2003 年には 1 月に採取したカキの陽性率が最も高く、それぞれ 60%、45.7%であり、次いで 2 月の 25%、16.1%であった。これ以外の月にはノロウイルス遺伝子は検出されなかった。これに対し 2003 年から 2004 年にかけては、ノロウイルス陽性率が際だって低く、12 月、1 月、2 月ともそれぞれ 13.3%であった。カキ関連食中毒の発生状況はカキからの遺伝子検出率と同様の推移を示し

た。

D. 研究考察

1. リアルタイム PCR による結果が 10 コピー未満であった検体について、2nd リアルタイム及び 2nd PCR を実施した。その結果、リアルタイム PCR の結果が 0 コピーであった検体のうち G1 で 9%、G2 で 15%から遺伝子が検出され、リアルタイム PCR で 0~1 コピーの検体からは G1 で 44%、G2 で 45%、1~10 コピーの検体では、G1 で 23%、G2 で 67%から遺伝子が検出された。リアルタイム PCR の定量限界である 10 コピーに満たない結果であっても、2nd リアルタイム及び 2nd PCR によりかなりの率で遺伝子が検出されたことから、10 コピーを検出限界とし、これをもって陰性、陽性を判定するのは、適当ではないと考えられる。3 方法による結果の比較において、G1 と G2 で 2nd における検出率が大きく異なり、また、G2 では 2nd リアルタイムの方が 2nd PCR より高い検出率であったが、G1 では双方にあまり差がないという結果が得られた。この結果は用いたプライマーのうち、G1-SKR プライマーの配列の影響で、1stPCR の段階で遺伝子増幅に制限がかかっている可能性が考えられる。

定量限界以下の 10 コピー未満の検体では、逆転写反応後の反応液中の cDNA 量が非常に少ないと考えられ、ここから 4 μ l をとった場合に、PCR の系に cDNA を持ち込めるか否かにより 2nd の結果が変わってしまう可能性があり、純粋にリアルタイム PCR の結果の確認とはならないが、0 コピーでない場合は陽性の可能性が非常に

高いと思われる。このことは、10 コピー未満の検体のリアルタイム PCR の増幅曲線において、コントロールと同様な、蛍光強度の特異的かつ急激な増加が 40 サイクル以降で確認される事からも支持されるであろう。

2. リアルタイム PCR で 0 コピー以外の結果は陽性である可能性が高いが、前述したように、cDNA をリアルタイム PCR の系に持ち込めるか否かが、再現性の面でも問題となる。表 3 に示したように、同一ロットのカキ 10 個を複数回検査した場合、その検査結果にばらつきが見られた。個々のカキは生産筏の中での位置等により汚染状況が異なる事が判明しているが、1 個のカキにおいても複数回の検査結果が異なっていた。表 3 の G2 についてみると、半数のカキでは 3 回の検査のうち 1 回は 0 コピーという結果がでており、1 個のカキを 1 回だけ検査したのでは、陰性になってしまう可能性も高い。複数のカキを 1 ロットとするか、1 個のカキについても複数回の検査を行うかが必要となってくると考えられる。

3. カキの場合、G1、G2 の両方が陽性となる場合も多く、また、患者から検出された NV の genotype と一致しない事も多い。したがって、疫学調査の 1 資料として考えるならば、G1、G2 を区別して判定する必要もないと思われる。そこで、1 ロットにつき 3 個程度のカキを検査しその結果を G1、G2 も区別せず一括して判定しても不都合はないと思われる。このような判定基準により市販生カキの検査結果を判定すると、リアルタイム PCR 陽性のロットの 82% は 2nd リアルタイムで遺伝子の存在

を確認でき、リアルタイム PCR 陰性のロットでも 75% が 2nd リアルタイムの結果と一致し、リアルタイム PCR をカキ検査に用いることも可能と考えられる。反面、行政対応を考える上では 82% の一致率にしかならないため、リアルタイム PCR の結果が 0 コピー以外なら陽性とするという事については、様々な機関や団体との合意が必要であろう。

4. 食中毒に関連したカキと同一の湾内で、当該カキの採取日の前後に採取されたカキについて、ノロウイルス遺伝子検査を実施した。表 4 に示したとおり、事件関連のカキの採取日以後のカキに 0 コピー以外の結果が多く、より汚染されていると考えられた。リアルタイム PCR の結果はいずれも 1 コピー未満であり、非常に小さい数値であるが、陽性である可能性は高い。事件前の S1 から S3 の 1 ロットでは 2nd リアルタイムと 2nd PCR はすべて陰性であったが、S4 から S6 の 1 ロットの検査では 3 個中 2 個で 2nd リアルタイム陽性、1 個で 2nd PCR 陽性であった。リアルタイム PCR の結果についてロットごとの判定を行うと、これらのロットはともに陽性という判定となる。事件後採取カキでは、2nd リアルタイムと 2nd PCR の陽性検体が増加しており、2 ロットとも陽性と判定された。食中毒に関連しているカキであってもリアルタイム PCR の結果は 10 コピー以下であることが多いため、陽性判定の基準は慎重に検討しなければならないだろう。

5. 2001 年度から 2003 年度の間に実施した市販生カキのリアルタイム PCR 検査の結果を、0 コピー以外を陽性と判定した場合の陽性率と、カキ関連の食中毒の発生

状況は同じ様な推移を示した。リアルタイム PCR 結果判定の妥当性を検証する上での一資料になると思われる。

E. まとめ

リアルタイム PCR を用いてカキの検査を実施する場合、ほとんどのカキは実測値で 10 コピー以下であり、定量限界値以下となるため、数値の再現性が確保できない。しかし、定量限界値以下であっても、陽性である可能性は高く、定量限界値である 10 コピー以下を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 によるカキの検査では、これを定性的な検査ととらえ、判定の基準としては 0 コピーの場合を陰性、それ以外を陽性と判定する方向で検討していく事が必要ではないかと考えられる。しかし、この場合、実験的に 0 コピー以外の検体の陽性を確認することには、無理な面もあり、今後は、リアルタイム PCR の結果が 0 コピー以外なら陽性とするという事について、様々な機関や団体との合意形成が必要であろう。さらに、判定については、ロットを構成するカキ 1 個ずつについて個別に判定をするのではなく、ロット単位での判定をする方が、より、現実に即しているのではないかと考えられる。1 ロットをいくつのカキにすればよいかについては今後さらなる検討が必要と考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 篠原美千代 : SRSV の検査法、HACCP、9、30-33、2003

2) 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 : 5782-5786. 2003

2. 学会発表

1) 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、10.27-29、P. 295 京都市

2) 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及び A 型肝炎ウイルス汚染状況、第 51 回日本ウイルス学会、2003、10.27-29、P. 294 京都市

3) 西香奈子、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、10.27-29、P. 295 京都市

G. 知的所有権の出願・登録状況

なし

表1 リアルタイムPCRと2ndリアルタイム・2ndPCRの結果比較(G1)

リアルタイムPCR		2nd			
		2ndリアルタイム		2ndPCR	
コピー数	検体数	+	-	+	-
0	57	5(9%)	52(91%)	5(9%)	52(91%)
0~1	16	6(38%)	10(62%)	7(44%)	9(56%)
1~10	31	6(19%)	25(81%)	7(23%)	24(77%)
10以上	3	3(100%)	0	3(100%)	0

表2 リアルタイムPCRと2ndリアルタイム・2ndPCRの結果比較(G2)

リアルタイムPCR		2nd			
		2ndリアルタイム		2ndPCR	
コピー数	検体数	+	-	+	-
0	71	11(15%)	60(85%)	3(4%)	68(96%)
0~1	60	27(45%)	33(55%)	20(33%)	40(67%)
1~10	55	37(67%)	18(33%)	28(51%)	27(49%)

表3 再現性の検討

	リアルタイムPCR					2ndリアルタイム				2ndPCR	
	G1	G1	G2	G2	G2	G1	G1	G2	G2	G1	G2
101	0	0	1.18	0.33	0	-	-	-	-	-	-
102	0.65	0	0.64	0.74	NT	-	-	-	-	-	-
103	0	0	1.54	0	0.32	-	-	-	-	-	-
104	0	0	0	0.98	0.3	-	-	-	-	-	-
105	0	0	0.92	0	0.51	-	-	+	-	-	-
106	1.43	0	5.92	1.49	1.23	-	-	+	-	-	+
107	0	0	1.9	1.69	0.76	-	-	+	+	-	+
108	0.73	0	3.41	1.06	0.57	+	-	+	-	+	+
109	0.24	0	1.02	1.21	0	-	-	-	-	-	-
110	1.44	0.03	1.79	1.34	0.24	-	+	-	-	-	-

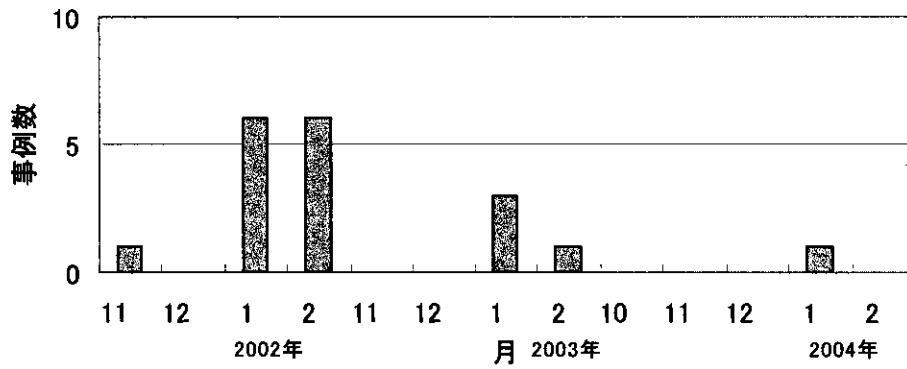
表4 ロットごとの判定

リアルタイムPCR	2ndリアルタイム	2ndPCR	ロット数	一致率
+	+	+	22	28/34(82%)
+	+	-	6	
+	-	+	0	
+	-	-	6	
-	+	+	1	9/12(75%)
-	-	+	0	
-	+	-	2	
-	-	-	9	

表5 食中毒関連カキの検査結果

検体	リアルタイムPCR		2ndリアルタイム	2ndPCR
	1回目	2回目		
S1	0	0.34	-	-
S2	0	0	-	-
S3	0	0	-	-
S4	0	0	-	-
S5	0	0	+	-
S6	0.56	0	+	+
S7	0.18	0	+	+
S8	0	0	+	+
S9	0	0.08	+	-
S10	0.61	0.46	+	+
S11	0.35	0.23	+	+
S12	0.83	0.01	-	-
S13	0.53	0.26	-	-

カキ関連食中毒発生状況



生カキにおけるノロウイルス遺伝子検出状況

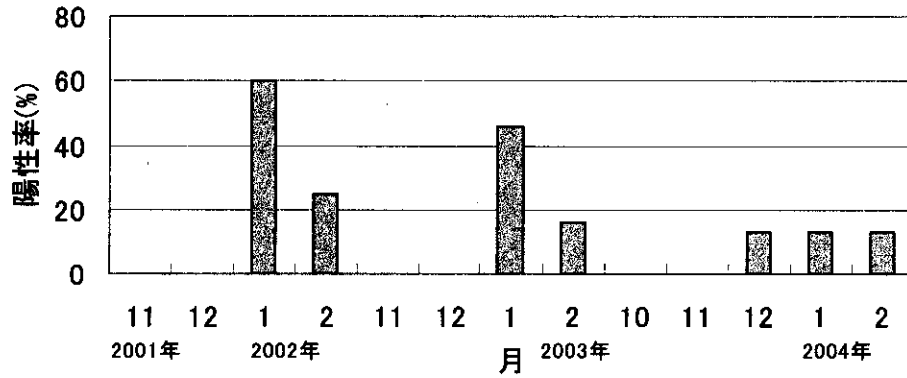


図1 カキ関連食中毒発生状況と市販カキのノロウイルス遺伝子陽性率

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 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

分担研究者 木村博一（群馬県衛生環境研究所）

協力研究者 齋藤美香 長井 章 森田幸雄 石岡大成 小澤邦壽（群馬県衛生環境研究所）

研究要旨

本邦の内陸部で発生する食中毒におけるノロウイルス（NV）の関与を明らかにするため、群馬県を内陸部のモデルとした過去3年間の疫学調査を行った。また、NVの感染源の1つと考えられる県内で流通していた生食用カキについても疫学調査を行った。その結果、調査期間中、県内で発生した食中毒の約30%はNVが原因であり、患者及びカキから検出されたNVは遺伝学的に多様であることも推定された。

A. 研究目的

本邦で発生する食中毒患者の多くの事例がノロウイルス（NV）を原因物質とすることが最近の調査で明らかになりつつある。また、秋期から冬季にかけて発生する感染性胃腸炎患者の多くの事例もNVが原因であることがわかってきた。NVの感染はカキ等の二枚貝の喫食あるいはNVに感染した患者の吐物や糞便等を介したヒト-ヒトによるものと考えられている。また、食の多様化及び食品の流通の広域化に伴い、内陸部に位置する都道府県においても、多くの食中毒事例や感染性胃腸炎にNVが関与していることが推定されるが詳細については不明な点が多い。本研究は内陸部に位置する群馬県をモデルとし、患者及びカキ由来のNVの疫学調査を行うことを目的とした。

B. 研究方法

食中毒については、平成13年11月から16年3月の間に本県で発生したNVによる11

事例を対象とした（表1）。カキについては平成13年12月、14年12月および15年12月～16年1月に本県で流通していた生食用カキ59検体を調査対象とした（表2）。患者糞便は9倍量のPBSを加え、ホモジュネートを作成後、粗遠心後（10000rpm、30分）得られた上清を材料とした。カキは、常法により中腸線を取り出し、湿重量を測定後、9倍量のPBS(-)を加え、ホモジュネートを作成した。ホモジュネートを粗遠心後（10000rpm、30分）、上清を30%ショ糖密度勾配法によって濃縮精製した分画を材料とした。NVキャプシド遺伝子をRT-PCRによって増幅した。プライマーはキャプシド領域（1st PCR:G1: COG1F/G1SKR、G2:COG2F/G2SKR、ALPF/G2ALSQR、Nested PCR:G1SKF/G1SKR、G2:G2SKF/G2SKR、G2SKF/G2ALSQR）を用いた。また、リアルタイムRT-PCR法によって、NVキャプシド遺伝子のコピー数も求めた。リアルタイムPCRはTaqManプローブを使用し、cDNAを20倍希釈し、5μlを鋳型と