

し、G1:COG1F/COG1R、G2:COG2F・ALPF/COG2R をプライマーとプローブとして用い、Light Cycler によって NV キャプシド遺伝子コピー数を測定した。また、ダイレクトシーケンス法により、NV の cDNA の塩基配列を決定し、近隣結合法 (N-J 法) による分子系統樹解析も行った。

C. 研究結果

平成 13 年は 12 事例中 4 事例 (本研究においては 1 例のみ対象)、14 年は 9 事例中 5 事例、15 年は 12 事例中 3 例、16 年は 1~3 月まで 2 事例において NV が原因物質である食中毒事例であることが推定された (表 1)。本調査の対象となった食中毒事例における患者総数は 370 人で喫食者数の約 32% (370/1154) が発症したこともわかった。推定原因食品として、会食料理が多かったが、小学校の餅つき大会で作った餅を原因とする事例や調理パ

ンを原因とする事例もあった。また、患者総数が 50 名を超える事例もあった。

調査対象としたカキの詳細を表 2 に示す。Nested-PCR によって、約 20% のカキから NV 遺伝子が検出された。そのうち、9 検体においてはシーケンス解析と分子系統樹解析も可能であった。Nested-PCR でカキから検出された GI 型の遺伝子はシーケンス解析が困難な PCR 産物も比較的多かった。調査期間中に検出された NV キャプシド遺伝子の分子系統樹を図に示す。カキから、検出された NV の遺伝子型は GI 型 (Norwalk virus type) が多かったが、患者から検出された NV は GII 型 (Snow mountain virus type) が多かった。また、検出された NV キャプシド遺伝子には比較的大きな多様性が見られた。さらに、15% (9/59) のカキに 100 コピー以上の NV 遺伝子が検出された。

表 1 群馬県におけるノロウイルス食中毒事例 (H13 年 4 月~15 年 3 月)

| No. | 月日 | 原因食品 | 原因施設 | 喫食者数 (人) | 患者数 (人) |
|-----|-----------|------|--------|----------|---------|
| 1 | H13.11.10 | 会食料理 | 飲食店 | 96 | 38 |
| 2 | H14.1.31 | 会食料理 | 飲食店 | 42 | 21 |
| 3 | H14.3.25 | 給食 | 飲食店 | 279 | 102 |
| 4 | H14.5.4 | 旅館食事 | 旅館 | 80 | 30 |
| 5 | H14.12.12 | 会食料理 | 飲食店 | 50 | 11 |
| 6 | H14.12.21 | 会食料理 | 飲食店 | 121 | 13 |
| 7 | H15.1.16 | もち | 学校 | 76 | 30 |
| 8 | H15.1.26 | 会食料理 | 飲食店 | 81 | 14 |
| 9 | H15.4.5 | 会食料理 | 飲食店 | 54 | 16 |
| 10 | H16.1.28 | 会食料理 | 飲食店 | 33 | 12 |
| 11 | H16.3.16 | 製造パン | パン製造業者 | 242 | 83 |
| 計 | | | | 1154 | 370 |

D. 考察

本研究により、過去3年間、群馬県では他県と同様にNVを原因とする食中毒が多発していたことがわかった。食中毒の推定原因食はカキ以外あるいは不明の事例もあった。食品取扱従事者によって食中毒が引き起こされたことが推定された事例もあった。また、比較的大型の食中毒事例(患者数50名以上)もあった。

リアルタイムPCR法によって検体中のNV遺伝子数が定量可能になったことから、カキに含まれるNVのリスク評価等が行えるようになりつつある。西田らは本邦の2海域において、約20%の生食用カキにNV遺伝子が検出されること、さらにNVが検出されたカキの半分以上に比較的多く(100 copies/oyster)の遺伝子が存在することを明らかにした(論文発表1参照)。本研究においてもこれらの報告と類似したデータが得られたことから、市販されている生食用のカキには一定の頻度で食中毒を起こしうる感染単位のNVが含まれていることが推定された。また、ヒト及びカキから検出されるNV遺伝子には比較的大きな多様性が見られることが最近の研究で明らかになりつつある。図に示すように、今回のデータにおいても患者及びカキ由来のNVキャプシド遺伝子には最大で約20%の遺伝学的多様性が見られたことから、調査期間中本県における食中毒の原因となったNVは遺伝学的に多様であったことも推定された。以上のことから、群馬県のような内陸部に存在する「海なし県」においてもかなりの割合でNVが食中毒に関与し、他の報告と同様に原因となったウイルスは遺伝学的多様性をもつことも推定された。

E. 結論

群馬県のような内陸部においても他の都道府県と同様に多くの食中毒事例はNVが原因であることが推定された。食中毒の原因食品は多彩であった。県内で流通していた生食用カキの約20%にNVが検出され、その大半が100コピー以上のNV遺伝子を保有していた。また、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示唆された。

F. 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, and 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, and Kozawa K, Keratoconjunctivitis caused by echovirus type 13 in Japanese children, *Pediatr Infect Dis J*, 22(8):758-759(2003).

2. 学会発表

なし

表2 カキから検出・定量されたNVキャプシド遺伝子

| 検体NO. | 採取海域 | 購入月日 | NV遺伝子コピー数 (Copies/g中腸腺) | RT-PCR結果 | | 系統樹解析結果 | |
|-------|-----------------------|--------|--|--|---------|---------|----|
| | | | | Nest G1 | Nest G2 | | |
| 1 | 宮城県北部 | 13年12月 | ND | + | + | G2 | |
| 2 | 石巻湾 | | | | + | G2 | |
| 3 | 宮城県 | | | | + | G2 | |
| 4 | 宮城県 | 14年2月 | | | + | G2 | |
| 5 | 宮城県松島 | | | | + | G2 | |
| 6 | 宮城県荻浜湾 | 15年12月 | | ND | ND | ND | ND |
| 7 | | | | | | | |
| 8 | | | | | | | |
| 9 | 宮城県荻浜湾 | | | | | | |
| 10 | | | | | | | |
| 11 | | | | | | | |
| 12 | 岡山県日生・牛窓 | | | | | | |
| 13 | 岡山県日生・牛窓 | | | | | | |
| 14 | 宮城県海城 | | | | | | |
| 15 | | | | | | | |
| 16 | | | | | | | |
| 17 | 岡山県日生・牛窓 | | | | | | |
| 18 | 宮城県志津川湾 | | | | | | |
| 19 | | | | | | | |
| 20 | | | | | | | |
| 21 | 宮城県海城 | | | | | | |
| 22 | | | | | | | |
| 23 | | | | | | | |
| 24 | 宮城県中部海城 | | | | | | |
| 25 | | | | | | | |
| 26 | | | | | | | |
| 27 | 岡山県日生・牛窓 | | | | | | |
| 28 | | | | | | | |
| 29 | | | | | | | |
| 30 | 宮城県志津川湾 | | | | | | |
| 31 | | | | | | | |
| 32 | | | | | | | |
| 33 | 宮城県牡鹿半島海城 | | | | | | |
| 34 | | | | | | | |
| 35 | | | | | | | |
| 36 | G1: 9.9×10^4 | | | | | | |
| 37 | | | | | | | |
| 38 | | | | | | | |
| 39 | 広島湾北部 | 16年1月 | G1: 9.8×10^4 G2: 1.2×10^5 | + | + | G1, G2 | |
| 40 | | | | G1: 1.2×10^5 G2: 8.7×10^4 | + | + | G2 |
| 41 | | | | | ND | + | + |
| 42 | | | | | | | |
| 43 | | | | | | | |
| 44 | 宮城県海城 | | | | | | |
| 45 | | | | | | | |
| 46 | | | | | | | |
| 47 | 広島湾北部 | | | | | | |
| 48 | | | | | | | |
| 49 | | | | | | | |
| 50 | 宮城県海城 | | | | | | |
| 51 | | | | | | | |
| 52 | | | | | | | |
| 53 | 兵庫県坂庭 | | | | | | |
| 54 | | | | | | | |
| 55 | | | | | | | |
| 56 | G1: 2.0×10^3 | | | | | | |
| 57 | | | | | | | |
| 58 | | | | | | | |
| 59 | 宮城県奥松島鳴瀬 | | | | | | |
| 59 | | | | | | | |
| 59 | | | | | | | |
| 59 | 岩手 | | | | | | |
| 59 | | | | | | | |
| 59 | | | | | | | |
| 59 | G1: 1.6×10^4 | | | | | | |
| 59 | | | | | | | |
| 59 | | | | | | | |

ND, not detected

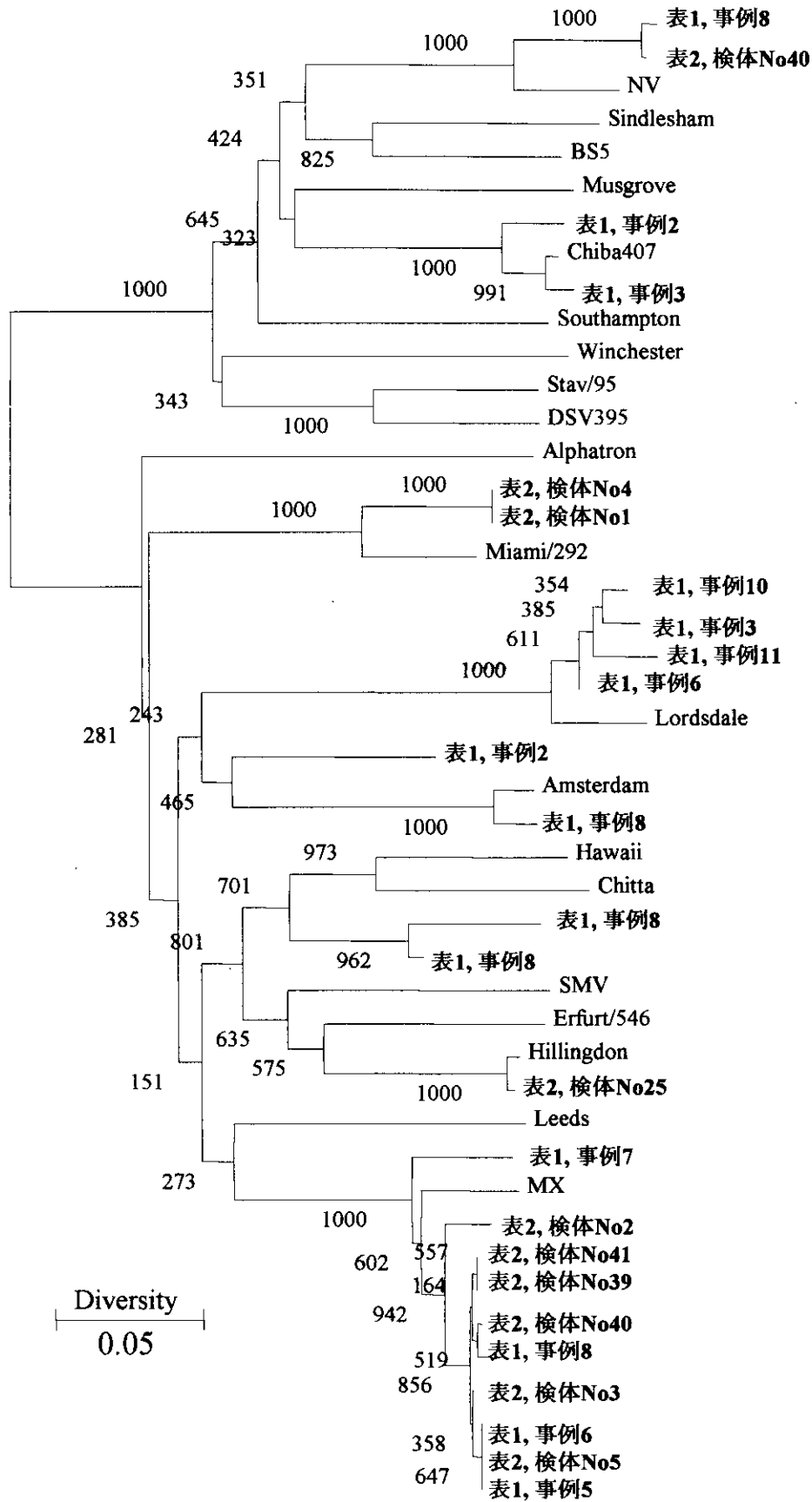


図 食中毒患者およびカキ由来ノロウイルス分子系統樹(キャプシド遺伝子)

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 三重県の養殖カキにおける Norovirus 汚染状況調査

分担研究者 荒川(西) 香南子(三重県科学技術振興センター保健環境研究部
微生物研究グループ研究員)

研究要旨

Norovirus は冬季に発生する小児の感染性胃腸炎や集団発生事例で検査が行われている。NV の発生様式には感染症型とカイ類の喫食による食中毒があり、発生状況はほぼ同じである。県内にカキ養殖海域を持つことから、安全なカキを提供するためカキ養殖海域の定点観測を行い、カキの NV 汚染状況を把握するとともに、海域汚染対策の一助として NV の動向について調査を行った。カキの NV 陽性数は海水温や降雨などの環境因子の影響や陸上での NV の流行等の影響を受けており、様々な要因が関与している。ヒトで検出される NV よりも多くの種類がカキでは検出されており、ヒト以外の動向としてウシやブタ等の家畜糞便の検査を実施した。NV の動向は現在考えられるもの以外にも存在することが示唆され、今後も調査を行い、動向を究明するとともに、ウイルス汚染のないカキを提供するための浄化方法等の確立が望まれる。

A. 研究目的

Norovirus(NV)は1997年から食中毒の原因物質として追加され、検査方法が示されたことによって集団発生や小児の下痢症等で多くの検査が行われている。NV は感染症発生動向調査や集団発生でも大部分は冬季に発生が認められる。

集団発生事例の発生様式は食品による食中毒とヒト-ヒト感染による感染症事例があり、発生状況はほぼ同数である。食中毒事例で疑われた、または判明した食材にはカイ類、特にカキが多い。ウイルス汚染のない安全なカイ類の提供により約半数の集団発生事例が防止できると考えら

れる。しかし、カキ等の食材の NV 検査はウイルス量も少なく、また時間を要すること、さらに、カキの汚染状態に個体差があることから出荷前の製品検査による安全性の確認は難しい。そこでカキの汚染状況を推測するため環境因子等との関連を検討するとともに、カキで検出された NV の汚染源を検討するために調査を行った。

B. 研究方法

1.検査材料及び前処理方法

a) カキ

カキの養殖を行っている 4 海域(A・B・C・D)に定点(a・b・c・d)を定め

た。'01, '02年度はB海域に定点を2カ所(b-1・b-2)定めた。1回に定点につき5個のカキを採取し検査に用いた。定点、採取月日は表1に示す。

カキは中腸線を摘出し、9倍量('01年度は4倍量)のPBS(-)を加えてホモジナイズを行った。3,000rpm, 15分遠心後、上清を24% PEG/1.5M NaClを加え4℃一晩または室温2時間以上放置した。3,000rpm, 30分遠心後、上清に24% PEG/1.5M NaClを加え4℃30分放置した。12,000rpm, 30分遠心後、沈渣をEagle's MEM 500 μ Lで浮遊し、RNA抽出に用いた。

b)海水

海水はカキ養殖海域のうち'01年度は2海域、'02年度は3海域で1回あたり20L海水を採取した。

'01年度の4回目までは陽電化膜法、5回目以降と'02年度は陰電化膜法により前処理を行った。海域、採取月日は表2に示す。

c)ウシ及びブタ糞便

'03年6月から'04年1月までに県内のA食肉センターに搬入されたウシ28頭およびブタ33頭の糞便を採取した。

糞便はEagle's MEMで10%乳剤とし10,000rpm10分遠心後上清をRNA抽出に用いた。

d)集団発生事例

'01から'03年度の12月から2月までにウイルスが原因と疑われた事例について糞便、吐物および食材の検査を行った。

糞便や吐物などのヒト検体はEagle's MEMで10%乳剤とし1,000rpm10分遠

心後上清をRNA抽出に用いた。食材はカキなどを含むKAI類はカキと同様に実施した。それ以外の食材はカキと同様、またはPBS(-)10mLに4℃1時間放置後3,000rpm, 15分遠心した上清に24% PEG/1.5M NaClを加え4℃で一晩放置または室温で2時間以上攪拌し、以後カキと同様に実施した。

e)感染症発生動向調査

'01から'03年度の10月から3月までに当研究部に搬入された感染症発生動向調査病原体定点病院からの糞便および感染性胃腸炎患者の吐物や咽頭拭い検体について検査を実施した。

糞便および吐物は2% FBSを加えたEagle's MEMで10%乳剤とし3,000rpm20分遠心を2回行った。咽頭拭い検体は2% FBSを加えたEagle's MEM 3mLで綿球をほぐし、3,000rpm20分遠心を行った。遠心上清をRNA抽出に用いた。

2.RNA抽出

RNA抽出にはQIAmp Viral RNA Mini Kitを用い、プロトコールに従って行った。前処理した検体の140 μ Lを用い、最終段階はカキ、海水('01年度)およびヒト由来検体は60 μ L、カキ、海水、食材('02年度以降)、ウシ・ブタ糞便検体では30 μ Lのbuffer AVEでRNAの溶出を行った。

3.cDNAの作製

抽出したRNAをカキ、海水('01年度)およびヒト由来検体では24 μ L、カキ、海水、食材('02年度以降)、ウシ・ブタ糞便検体では全量を使用し、DNase Iで37℃30分反応させDNAを分解した。DNase処理済みRNAをrandom hexamerを用いてヒト由来検体ではM-MLV RT、それ以

外では Super Script II RT で 42°C1 時間反応させ、cDNA を作製した。

4.PCR

PCR に使用した primer set は表 3 に示す。作製した cDNA を用いて、ヒト由来検体では SK 系及び COG 系の primer で 1st PCR を実施し、それ以外では COGF/SKR の primer で 1st PCR を実施後、SK 系及び COG 系の primer で 2nd PCR を行った。

PCR 反応後、agarose gel による電気泳動をし、ethidium bromide による染色後判定を行った。いずれかの primer set でバンドが認められたものについて RT-PCR 法陽性とした。COG 系を除いて陽性となった PCR 産物は国立感染症研究所にシーケンスを依頼した。

5.realtime PCR

ヒト由来検体以外の作製した cDNA を '01 年度は国立感染症研究所、'02 年度以降は埼玉県衛生研究所に依頼し、NV 及び HAV の定量を実施した。

6.環境因子の測定

'01 年度と '02 年度はカキと環境因子の関連性を見るために、定点カキの採取時に海水温及び塩分比重の測定を行った。また、'01 年度から '03 年度までカキ養殖海域近辺の気温は管轄消防署、降雨量は管轄消防署及び南勢志摩県民局志摩建設部の測定データを用いた。

C. 研究結果

1.カキにおける NV 及び HAV の RT-PCR による検出結果

定点カキにおける NV の RT-PCR 法による検出結果を表 4 に示す。各定点では

1 回で 5 個採取し、いずれかの primer set で陽性となった個数を表に示した。

HAV は採取したすべてのカキで検出されなかった。

2.海水における NV 及び HAV の RT-PCR による検出結果

海水では '03 年 2 月 3 日に採取した A 及び B 海域の海水で G1-SK 系の primer で NV 陽性となったが、それ以外では検出されなかった。HAV については採取したすべての海水で検出されなかった。

3.ウシ及びブタ糞便における NV 検査結果

ウシ及びブタ糞便における NV の RT-PCR 法及び realtime PCR 法による検出結果を表 5 に示す。RT-PCR 法ではウシ糞便 28 検体中 2 検体、ブタ糞便 33 検体中 1 検体で陽性となった。ウシ糞便ではいずれも G1-SK 系 primer、ブタ糞便では G2-SK 系 primer で陽性となったが、塩基配列は確認できなかった。RT-PCR 法で陽性となったブタの 1 検体は定量されたが、ウシ 2 検体、ブタ 1 検体は realtime PCR 法では検出されなかった。また RT-PCR 法では検出されなかったが realtime PCR 法でウシ 1 検体、ブタ 1 検体で検出された。

4.集団発生事例

'02 年度から '03 年度に当研究部に搬入された事例について表 6 に示す。'01 年度の事例 6、'02 年度の事例 1, 3, 9、'03 年度の事例 1, 3 は食中毒事例である。集団発生事例で別ロットを含めて食材の検査は 5 事例で実施し、陽性となった事例は 2 事例あった。'02 年度の事例 3 は保存検食の大アサリで陽性となったが、塩基配列を確定することは出来なかった。もう

1 事例は'02 年度事例 8 で別ロットのパックカキの 3 個から検出され、うち 1 個は患者と類似した Chiba407 であった

5. 感染症発生動向調査

'01 年度から'03 年度に当研究部に搬入された糞便検体と感染性胃腸炎と診断された患者の咽頭拭い液や吐物の検査を行った結果を図 1 に示す。図には'00 年度の結果を参考に示す。'00 年度と'02 年度は第 50 報告週、'01 年度は第 49・51 報告週、'03 年度は第 51 報告週にピークが見られた。ピーク週の陽性数は'02 年度が 9 検体と最も多く、次に'00 年度が 7 検体、'01 年度・'03 年度は 3 検体であった。検出された NV はすべて G2 であり、そのうち塩基配列が確認できたものは'02 年度は 1 検体のみ MX で他はすべて Lordsdale、'03 年度は Lordsdale と Miami であった。

6. カキ及び海水の realtime PCR 法による定量値

カキの NV の結果を表 7 に示す。カキの定量信頼値'01 年度は 900copy/g、'02 年度以降は 450 copy/g とし、定量信頼値未満の定量値については陽性とした。'01 から'03 年度での総数 690 個のカキのうち G1 では RT-PCR 法では 76 個(11.0%)が陽性、614 個(89.0%)が陰性であった。realtime PCR 法は 186 個(27.0%)で陽性以上、504 個(73.0%)で 0copy/g であった。また G2 では RT-PCR 法では 71 個(10.3%)が陽性、619 個(89.7%)が陰性であった。realtime PCR 法は 319 個(46.2%)で陽性以上、371 個(53.8%)で 0copy/g であった。

HAV は'01 年度の 1 月 29 日に定点 b

で 1 検体、2 月 25 日に定点 d で 1 検体陽性となり、定量値はそれぞれ 1.9×10^3 copy/g、 6.1×10^3 copy/g で定量信頼値以下であった。

海水は'01 年度に 12 検体、'02 年度に 11 検体合計 23 検体の検査を実施した。NV の結果を表 8 に示す。海水の定量信頼値'01 年度は 900copy/L、'02 年度は 450 copy/L とし、定量信頼値未満の定量値については陽性とした。HAV は全検体で 0copy であった。

7. 遺伝子解析

検出された NV をダイレクトシーケンスで塩基配列が確定できたものについて NJ 法による解析し G1、G2 の系統樹を図 2、図 3 にそれぞれ示す。

感染症発生動向調査では大部分が Lordsdale であり、各年度で最初に検出された塩基配列を基準として相同性は 93.2%から 97.1%だった。集団発生事例でカイ類の関与がなかった事例では同一事例で検出された NV の相同性は 100%であり、SMV、MX、Lordsdale、Miami が各 1 事例ずつであった。集団発生事例でカイ類の関与がある事例で検出された NV は genogroup や遺伝子型は一致しなかった。また、感染症発生動向調査やカイ類の関与が見られない事例では検出されない遺伝子型が定点カキから検出された。

6. 環境因子

カキ採取時の海水温と養殖海域近辺の気温を図 4、カキ採取時の塩分比重と降雨量を図 5 に示す。また各月の平均気温を表 9 に示す。気温は'01 年度が最も高く、'02 年度が最も低かった。海水温が 10℃以下になった時期は'02 年度が 1 月

初旬と最も早く、'01年度は1月中旬であった。降水量は50mmを越える降雨は'01、'02年度に認められ、'01年度では塩分比重の低下が認められたが'02年度では認められなかった。'03年度は12月以降の降雨が非常に少なかった。

D. 考察

ヒトに感受性のあるNVはヒトの体内でのみ増殖し、下水道等を経由してカキ養殖海域を汚染し、カキが体内に取り込み、濃縮していると考えられている。従って、カキへのNV供給源を動向を含めて解明し、カキの生体反応を踏まえて検討する必要があると考えられる。

1. NVの動向

県内でのNV検出状況を図6に示した。NVの増殖機会として小児における感染症発生動向調査と冬季における集団発生事例について調査を行った。感染症発生動向調査では'02年度は流行が大きく、'01、'03年度の流行は小さかった。また、'03年度の初冬は気温が高かったこともあり、'01、'02年度より1~2週ピークが遅かった。

集団発生事例は発生様式がヒト-ヒト感染の事例(感染症型)とカイ類等の関与した食中毒に大別され、多発する時期も様式によって異なっていた。感染症型の発生は感染症発生動向調査のピークのころとほぼ一致していた。しかし、'02年度は感染症発生動向調査では遺伝子型がLordsdaleであったのに対し集団発生事例ではMXであり、異なっていた。また、感染症発生動向調査のピークから約4週後にカキからNVが検出され始めており、感

染症発生動向調査や感染症型の集団発生事例等としてNVの増殖が表面化し、これらがカキ養殖海域を汚染していることを推測していた。

しかし、感染症発生動向調査や感染症型の集団発生事例で検出されるNVはG2であるのに対し、'02年度以降はカキでG1が先行して検出されている。カキではヒトでは検出されていない遺伝子型も検出されていることから、従来考えられているNVの動向とは異なる経路が考えられた。

NVはヒト以外ではブタ糞便や家畜等の糞便の堆肥から検出されたという報告があることからウシ及びブタの糞便について検査を行った。ウシでは2検体、ブタでは1検体RT-PCR法で陽性となったが塩基配列の確認はできなかった。ウシではウシ型のNVがあり、今回使用しているprimerはそれらも検出するため、今回の陽性検体がヒト型かウシ型かを確認することは出来なかった。しかし、ウシやブタでの検出時期が9~11月で陽性検体も少なく、カキ養殖海域を汚染するほどの量を供給しているとは考えにくい。

感染症発生動向調査等ではG2が検出されていても、下水処理場での流入水等での検査ではG1も検出されているという報告があり、小児や集団発生事例以外に、老人や成人等今まで検査をあまり実施しておらず、今後検査対象を広くし、NVの動向の解明を進める必要があると考える。

2. カキの生体反応

カキは好条件であれば1時間に約18L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。プランクトンはカキ

のエラから口に運ばれ、カキは口で餌になるプランクトンと異物等の不要物を選別していると言われていたが、ウイルスについては選別できる大きさではなく、海水とともに体内に入っていることが推察される。これは当研究部で行ったポリオウイルスを用いたカキの汚染・浄化実験でも同様であった。カキの消化機能はアメーバ細胞による貪食、桿晶体による破砕・消化、中腸腺細胞の食作用による細胞内消化があると言われていた。カキは海水温が上昇すれば濾過量等も増加するが、海水温が低下すると濾過量や生体反応が低下することがわかっている。'01及び'02年度の調査でもカキでNVが検出され始めるのは海水温が10℃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NVが残存しやすくなっていることが考えられる。

また、気温の低下とともに大量の降雨があるとカキのNV陽性数が多くなる。陸上でNVの流行があると下水処理場等に大量にNVが流入される。大量の降雨があるとNVが完全に除去されずに処理水が放流され、比重の軽い放流水が海水と混じることなく表層を漂い、垂下しているカキを汚染することが考えられる。カキ養殖海域近辺で50mm以上の降雨があると海水の塩分比重が低下することがわかっており、'01年度では50mm以上の降雨の後比重が低下し、カキの陽性数が増加した。'02年度では50mm以上の降雨があったが比重の低下は認められなかった。しかし、カキでの陽性数は増加し、また、市の水産研究所の観測結果では養殖海域近辺の塩分比重の低下が認められたこと

から降雨による影響が推測できた。'03年度は50mm以上の降雨がなく、'01、'02年度の降雨量と海水比重の関係から海水比重の大きな変化はなかったと推測できる。

3. まとめ

'01年度はヒトでの流行は小さく、気温も高かったが、冬季に大量の降雨があったため、降雨後カキでの陽性数が増加した。'02年度はヒトでの流行が大きく、気温も低く、さらに降雨量も多かったことからカキでの陽性数は3年間で最も多かった。'03年度はヒトでの流行が小さく初冬の気温は'01年度と同様であったが、1月以降は'02年度程度まで低下した。降雨量は3年間で最も少なく、ヒトでの流行状況と降雨量の影響でカキでの陽性数は少なかったと考えられた。表10に陽性カキでの平均定量値と事例の発生状況を示した。Realtime PCR法による定量値も'03年度は小さかったことから、汚染量も少なかったことが考えられた。このように1,2で検討した事項が単独で影響するのではなく、それぞれの条件を満たしたときにカキでの検出数が増加することが推察された。

図8はカキの陽性数を年度別・定点別に示した。カキでNVが多く検出される定点は年度ごとに変化していた。また、ヒトで検出されているものでも従来のNVの動向では説明できないものもあり、さらにヒトで検出されているNVよりも多くの遺伝子型がカキから検出されていた。このことから、現在の推測されている動向とは異なる動向の存在が示唆され、今後解明する必要がある。また、現時点は定点観測と汚染

源調査の段階であり、カキからの NV の浄化方法については確立していない。安全なカキを提供するためにはウイルスの浄化方法が必須である。冬季の集団発生は約半分がカキ等のカイ類による食中毒であり、約半分は感染症型の集団発生である。適切な浄化方法の開発によって冬季の集団発生事例の約半分が防止できる可能性がある。また、今回の調査では realtime PCR 法による定量を実施した。NV は細胞培養が不可能なことから感染ウイルス量等の確認が出来ていない。現時点では少量のウイルス量の realtime PCR 法の判定基準等についての検討が必要であるが、検査法の改良が進めば感染ウイルス量等の基準が確定する可能性があると考えられる。NV の検査が広く実施されるようになって 7 年が経過した。広く検査を行ってきたことから徐々に解明されてきているが、まだ不明な点も残されており、今後さらに調査・研究を進め NV の動向を解明すると共に適切な NV 制御方法を検討していく必要があると考える。

E. 結論

当県では'02 年度までの調査を基に安全なカキを提供することを目的として「みえのカキ安心情報システム」を'03 年度より実施した。このシステムは検査内容の公開、生産者の浄化・作業工程に関する標準作業書の作製、施設の基準や生産者の衛生講習等を満たした施設や商品への安心マークの貼付等を行っている。検査項目は①伊勢湾周辺での感染性胃腸炎の流行、②養殖海域の海水温、③養殖海域周辺での降水量、④定点カキでの

NV 検出状況、⑤プランクトンにおける NV 検出状況、⑥カキによる健康被害であり、その検査結果を HP 上

(<http://www.pref.mie.jp/nhoken/kaki/>)で公開し、生産者や消費者がこの情報を元に自主的に判断し、対策をとるようにしている。定点カキの NV 検出数が増えると生産者は生食用の出荷自粛や加熱調理用へ用途変更、浄化時間の延長、降雨時ではカキの垂下深度変更などの対策を行い、カキの汚染防止、有症事件の未然防止に努めている。また、'02 年度に NV 陽性数の多かった定点での畜養を行わない等の対策も行った。

'03 年度はシステムによる対策と NV 自体の流行が小さかったことから有症苦情数も減少した。現時点では NV の動向に未だ不明な点も多く残されており、継続して調査・研究を行い、情報の精度をあげることとともに、確実な浄化方法を確立することで安全なカキの提供を行えるようになると思う。

F. 研究発表

1. 論文発表

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, 2003, 31:163-170

Tomoko Nishida, Hirokazu Kimura, Mika Saitoh, Michiyo Shinohara, Masahiko Kato, Shinji Fukuda, Tetsuya Munemura, Toshiyuki Mikami, Ayumi Kawamoto, Miho Akiyama, Yumiko Kato, Kanako

Nishi, Kunihiro Kozawa, and Osamu Nishio : Detection, Quantitation , and Phylogenetic Analysis of Noroviruses in Japanese Oysters. Applied and Environmental Microbiology ,2003,69 (5782-5786)

2. 学会発表

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, 岡山市, 2003.

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学術集会, 京都市, 2003.

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学術集会, 京都市, 2003.

表 1 カキの採取定点及び採取月日

| 定点 ^(※) | 2001 年度 | 2002 年度 | 2003 年度 |
|-------------------|----------------|-------------------|----------------|
| | a, b-1, b-2, c | a, b-1, b-2, c, d | a, b, c, d |
| 10 月 | 9 日 | | |
| 11 月 | 12 日 | | 25 日 |
| 12 月 | 10 日 | 16 日 | 1・8・15・22・29 日 |
| 1 月 | 15・28 日 | 8・20・29 日 | 5・12・19・26 日 |
| 2 月 | 4・12・18・25 日 | 3・17 日 | 2・9・16・23 日 |
| 3 月 | | 3 日 | 1・8・15・22 日 |
| 採取回数 | 9 回 | 7 回 | 18 回 |

※ 海域を大文字アルファベット, その海域の定点を小文字アルファベットで示す

表 2 海水の採取海域及び採取月日

| 海域 | 2001 年度 | 2002 年度 |
|------|--------------|---------|
| | A・B | A・B・C |
| 12 月 | 10 日 | |
| 1 月 | 15・28 日 | 8・20 日 |
| 2 月 | 4・12・18・25 日 | 3・17 日 |
| 3 月 | | 3 日 |
| 採取回数 | 7 回 | 5 回 |

表3 使用したprimer set

| | | NV | | | | |
|-----|---------|--------|-------|----------|--------|--|
| | | G1 | | | | |
| | | ヒト由来検体 | | ヒト由来検体以外 | | |
| | | G1-SK系 | COG1系 | G1-SK系 | COG1系 | |
| 1st | forward | G1-SKF | COG1F | | COG1F | |
| | reverse | G1-SKR | COG1R | | G1-SKR | |
| 2nd | forward | | | G1-SKF | COG1F | |
| | reverse | | | G1-SKR | COG1R | |

| | | NV | | | | HAV |
|-----|---------|----------------|------------|-----------------|-----------------|----------|
| | | G2 | | | | |
| | | ヒト由来検体 | | ヒト由来検体以外 | | |
| | | G2-SK系 | COG2系 | G2-SK系 | COG2系 | カキ・海水 |
| 1st | forward | G2-SKF | COG2F・ALPF | | COG2F・ALPF | HAV+2795 |
| | reverse | G2-SKR・G2AL-SI | COG2R | | G2-SKR・G2AL-SKR | HAV-3351 |
| 2nd | forward | | | G2-SKF | COG2F・ALPF | HAV+2903 |
| | reverse | | | G2-SKR・G2AL-SKR | COG2R | HAV-3296 |

表4 定点力キにおけるNV検出結果

| | | 定点 | | | | | |
|--------|------------|------------|-----|-----|---|------|------|
| | | a | b-1 | b-2 | c | d | |
| 2001年度 | 10月9日 陽性数 | 0 | 0 | 0 | 0 | N.D. | |
| | 11月12日 陽性数 | 0 | 0 | 0 | 0 | N.D. | |
| | 12月10日 陽性数 | 0 | 0 | 0 | 0 | N.D. | |
| | 1月15日 | G1 | 1 | | 1 | 1 | |
| | | G1+G2 | | | 1 | | N.D. |
| | | G2 | | 3 | 1 | 1 | |
| | 1月28日 | G1 | | 3 | 2 | 2 | |
| | | G1+G2 | | | 1 | 1 | N.D. |
| | | G2 | | | 1 | | |
| | 2月4日 | G1 | | 1 | 1 | | |
| | | G1+G2 | | | | | N.D. |
| | | G2 | | 1 | | | |
| | 2月12日 | G1 | | 1 | | 1 | |
| | | G1+G2 | | | | | N.D. |
| | | G2 | | | | | |
| | 2月18日 | G1 | | | 1 | 1 | |
| | | G1+G2 | | | | | N.D. |
| | | G2 | | 1 | | | |
| | 2月25日 陽性数 | 0 | 0 | 0 | 0 | N.D. | |
| | 2002年度 | 12月16日 陽性数 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1月8日 | | G1 | 2 | 1 | 3 | 2 | 1 |
| | | G1+G2 | | | | 1 | |
| | | G2 | | | | | |
| 1月20日 | | G1 | 1 | 1 | 1 | | |
| | | G1+G2 | | | 3 | | 2 |
| | | G2 | | 1 | | 2 | |
| 1月30日 | | G1 | 1 | 1 | | | 2 |
| | | G1+G2 | | 1 | 2 | | |
| | | G2 | | | 1 | 2 | 1 |
| 2月3日 | | G1 | | | 1 | | |
| | | G1+G2 | | | 2 | | |
| | | G2 | 2 | 3 | 2 | 3 | 2 |
| 2月17日 | | G1 | | | | | |
| | | G1+G2 | | | | | |
| | | G2 | 2 | 1 | 2 | | |
| 3月3日 | | G1 | 2 | | 1 | | 1 |
| | | G1+G2 | | | | | |
| | | G2 | | | | | |

| | | 定点 | | | | |
|--------|-------|----|-----|------|---|---|
| | | a | b-1 | b-2 | c | d |
| 11月25日 | 陽性数 | 0 | 0 | N.D. | 0 | 0 |
| 12月1日 | 陽性数 | 0 | 0 | N.D. | 0 | 0 |
| 12月8日 | G1 | | | | 1 | |
| | G1+G2 | | | N.D. | | |
| | G2 | | | | | |
| 12月15日 | G1 | 1 | | | | |
| | G1+G2 | | | N.D. | | |
| | G2 | | 1 | | 1 | |
| 12月22日 | 陽性数 | 0 | 0 | N.D. | 0 | 0 |
| 12月29日 | 陽性数 | 0 | 0 | N.D. | 0 | 0 |
| 1月5日 | G1 | 1 | 1 | | | 2 |
| | G1+G2 | | | N.D. | | |
| | G2 | | | | | |
| 1月12日 | G1 | | | | 2 | |
| | G1+G2 | | | N.D. | | |
| | G2 | | | | | |
| 1月19日 | G1 | | | | | 1 |
| | G1+G2 | | | N.D. | 2 | 1 |
| | G2 | | | | | 1 |
| 1月26日 | G1 | | | | 2 | 1 |
| | G1+G2 | | | N.D. | | |
| | G2 | | 2 | | | 1 |
| 2月2日 | G1 | 1 | | | | |
| | G1+G2 | | | N.D. | 1 | 1 |
| | G2 | | 1 | | 3 | 2 |
| 2月9日 | G1 | | 1 | | | |
| | G1+G2 | | | N.D. | | 1 |
| | G2 | | | | | |
| 2月16日 | G1 | | 1 | | | |
| | G1+G2 | | | N.D. | | |
| | G2 | | | | 1 | 3 |
| 2月23日 | G1 | 2 | 1 | | 1 | |
| | G1+G2 | | | N.D. | | |
| | G2 | | | | | |
| 3月1日 | 陽性数 | 0 | 0 | N.D. | 0 | 0 |
| 3月8日 | 陽性数 | 0 | 0 | N.D. | 0 | 0 |
| 3月15日 | 陽性数 | 0 | 0 | N.D. | 0 | 0 |
| 3月22日 | G1 | | 2 | | 1 | 1 |
| | G1+G2 | | | N.D. | | |
| | G2 | | | | | |

N.D.:not done

表5 ウシ・ブタ糞便のRT-PCR法とrealtime PCR法による定量値

| ウシ | | | | ブタ | | | |
|-----|----|----------------|-----------------------------|-----|----|----------------|-----------------------------|
| 検査数 | No | RT-PCR法 陽性数 | 定量値 ^(※) (copy/g) | 検査数 | No | RT-PCR法 陽性数 | 定量値 ^(※) (copy/g) |
| 6月 | 2 | 0 | | 3 | | | |
| 7月 | 4 | 0 | | 5 | | | |
| 8月 | 4 | 0 | | 5 | | | |
| 9月 | 4 | 18 | 1(G1) | 4 | 43 | 検出せず | G2:3.8×10 ⁴ |
| | | 19 | 検出せず | | | | |
| 10月 | 3 | 23 | 1(G1) | 4 | | | |
| 11月 | 4 | 0 | | 4 | 51 | 1(G2) | G2:2.5×10 ⁵ |
| 12月 | 5 | 0 | | 4 | | | |
| 1月 | 2 | 0 | | 4 | | | |

(※) 信頼限界:8.9×10³copy/g

表6 ウイルスが疑われた集団発生事例

| 事例 | 発生日 | 発生場所 | 原因食材(疑含む) | 貝類の関与 | 検体数 ^(※) | 陽性数 ^(※) | 遺伝子型 |
|------|-----|--------|-----------|----------|--------------------|--------------------|--|
| 01年度 | 1 | 12月3日 | 家庭 | 不明 | なし | 7 | G2:7 |
| | 2 | 12月8日 | 不明 | 不明 | なし | 14 | 0 |
| | 3 | 12月21日 | 飲食店 | 忘年会食事(?) | なし | 10 | G2:6 |
| | 4 | 1月16日 | 共同生活施設 | 施設内食事(?) | なし | 15 | G2:5 SMV |
| | 5 | 1月21日 | 飲食店 | 飲食店食事(?) | 有(県内産カキ) | 2 | G2:2 Hillingdon |
| | 6 | 1月21日 | 県外飲食店 | 飲食店食事(?) | 有(A県産カキ) | 0 | G1&2:2 Chiba,MX,Miami |
| 02年度 | 1 | 12月14日 | 飲食店 | 昼食弁当 | なし | 17(3) | G2:15(1) MX G1:1 Winchester, Musgrove |
| | 2 | 1月16日 | 飲食店 | カキフライ(?) | 有(県内産カキ) | 12(6) | G1&2:4 MX, DSV395orStav/95, Hilligdon G2:1(1) |
| | 3 | 1月13日 | 観光船 | 船上バーベキュー | 有(輸入貝類) | 13(13) | 0 |
| | 4 | 1月16日 | 飲食店 | カキフライ(?) | 有(B県産カキ) | 15(6) | G1:6 Winchester, Musgrove |
| | 5 | 1月18日 | 飲食店 | 不明 | 有(県内産カキ) | 12(3) | G1&2:1 Chitta or Hawaii, Miami/292 G2:4 Lordsdale |
| | 6 | 不明 | (大阪:不明) | 不明 | 不明 | 1 | 0 |
| | 7 | 1月20日 | 飲食店 | 不明 | 有(県内産カキ) | 10(7) | G1:3 |
| | 8 | 2月7日 | 家庭 | 酢ガキ(?) | 有(C県産カキ) | 1 | G1&2:1 Chiba407, Hillingdon |
| | 9 | 2月14日 | ホテル | カキフライ(?) | 有(D県産カキ) | 27 | G1&2:3 Hillingdon G2:19 G1:2 Chitta,Hillingdon ,MX G1&2:5 Chiba,Southampton G2:3 |
| 03年度 | 1 | 11月28日 | ホテル | ホテル食事(?) | 有(県内産カキ) | 22 | G1&2:5 Chiba,Southampton G2:3 |
| | 2 | 12月12日 | 飲食店(?) | 忘年会食事(?) | なし | 24(11) | G2:22(7) Miami |
| | 3 | 12月20日 | ホテル | ホテル食事(?) | なし | 36(20) | G2:33(3) Lordsdale |
| | 4 | 不明 | (大阪:不明) | 不明 | なし | 6(6) | 0 |
| | 5 | 1月11日 | 飲食店 | 不明 | 有(県内産カキ) | 2 | G2:2 Miami |
| | 6 | 1月22日 | 飲食店 | 不明 | 有(県内産カキ) | 10(2) | G1&2:2 G2:4 |
| | 7 | 1月26日 | 小学校 | 学校給食 | なし | 18 | G2:17 |
| | 8 | 1月31日 | 飲食店(?) | 飲食店食事(?) | 有(県内産カキ) | 4 | G2:4 |
| | 9 | 1月31日 | 飲食店(?) | 飲食店食事(?) | 有(県内産カキ) | 10 | G1&2:5 G2:4 |
| | 10 | 2月5日 | 自宅 | 酢ガキ(?) | 有(E県産カキ) | 2 | G1&2:1 G2:1 |

※:()内は従事者数

表7 カキのrealtime PCR法による定量値

| | | RT-PCR法 | | | | | |
|------|--|--------------|---------------|--------------|-----------------|---------------|--------------|
| | | G1 | | G2 | | | |
| | | - (%) | + (%) | 計 (%) | - (%) + (%) | 計 (%) | |
| 01年度 | 0 | 137 (76.1) | 16 (8.9) | 153 (85.0) | 135 (75.0) | 8 (4.4) | 143 (79.4) |
| | 陽性 | 10 (5.6) | 1 (0.6) | 11 (6.1) | 23 (12.8) | 3 (1.7) | 26 (14.4) |
| | 9.0×10 ² ~1.0×10 ³ | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0 (0.0) |
| | 1.0×10 ³ ~1.0×10 ⁴ | 12 (6.7) | 2 (1.1) | 14 (7.8) | 7 (3.9) | 2 (1.1) | 9 (5.0) |
| | 1.0×10 ⁴ ~1.0×10 ⁵ | 2 (1.1) | 0 (0.0) | 2 (1.1) | 0 (0.0) | 2 (1.1) | 2 (1.1) |
| 計 | 161 (89.4) | 19 (10.6) | 180 (100.0) | 165 (91.7) | 15 (8.3) | 180 (100.0) | |
| 02年度 | 0 | 68 (45.3) | 7 (4.7) | 75 (50.0) | 20 (13.3) | 2 (1.3) | 22 (14.7) |
| | 陽性 | 55 (36.7) | 14 (9.3) | 69 (46.0) | 95 (63.3) | 31 (20.7) | 126 (84.0) |
| | 4.5×10 ² ~1.0×10 ³ | 1 (0.7) | 5 (3.3) | 6 (4.0) | 1 (0.7) | 0 (0.0) | 1 (0.7) |
| | 1.0×10 ³ ~1.0×10 ⁴ | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 1 (0.7) | 0 (0.0) | 1 (0.7) |
| | 1.0×10 ⁴ ~1.0×10 ⁵ | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0 (0.0) |
| 計 | 124 (82.7) | 26 (17.3) | 150 (100.0) | 117 (78.0) | 33 (22.0) | 150 (100.0) | |
| 03年度 | 0 | 257 (71.4) | 19 (5.3) | 276 (76.7) | 203 (56.4) | 3 (0.8) | 206 (57.2) |
| | 陽性 | 72 (20.0) | 12 (3.3) | 84 (23.3) | 129 (35.8) | 20 (5.6) | 149 (41.4) |
| | 4.5×10 ² ~1.0×10 ³ | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 2 (0.6) | 0 (0.0) | 2 (0.6) |
| | 1.0×10 ³ ~1.0×10 ⁴ | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 3 (0.8) | 0 (0.0) | 3 (0.8) |
| | 1.0×10 ⁴ ~1.0×10 ⁵ | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0 (0.0) |
| 計 | 329 (91.4) | 31 (8.6) | 360 (100.0) | 337 (93.6) | 23 (6.4) | 360 (100.0) | |

realtime PCR法(copy/g)

表8 海水のrealtime PCR法による定量値

| | G1 | | | G2 | | |
|---------------|-------------------|----|----------|-------------------|----|-----------------|
| | RT-PCR法 | | 海域及び採取月日 | RT-PCR法 | | 海域及び採取月日 |
| | - | + | | - | + | |
| realtime PCR法 | 0 | 19 | 2 | 0 | 18 | 0 |
| (copy/L) | 陽性 | 0 | 0 | 陽性 | 4 | 0 (※) |
| | 1.9×10^3 | 1 | 0 | 2.2×10^3 | 1 | 0 海域B('02/2/27) |
| | 1.7×10^4 | 1 | 0 | | | 海域B('01/12/10) |

※ 海域B('03/1/8,'03/2/3), 海域C('03/1/20,'03/2/17)