

事例ずつであった。NVG1とG2の重複が3事例、G2のみが検出されものが6事例あった。食品からNVが検出されものはイカ塩辛のみであった(表3、4)。

平成14年度の7事例では、原因食品はカキと考えられたものが3事例で不明が4事例であった。原因食品が不明の4事例は病院、特別養護老人ホーム、自宅および飲食店での発生であった。すべての集団発生の患者からNVG2が検出された。また従事者の便では4事例からNVが検出され、1名がNVG1であった以外はすべてNVG2であった。食品は2事例から得られたが、実際に料理として出されたものはなく、飲食店等に残っていたカキの別ロットのものを検査したが全て陰性であった(表5、6)。

平成15年度の5事例では、原因食品はカキと考えられたものは2事例、ハマグリが1事例、弁当が2事例であった。NVG1とG2の重複が1事例、G2のみが検出されものが4事例あった。従事者の便では2事例からNVG2が検出され、そのうちの1事例(事例番号2)では従事者もカキを喫食したためNVが検出された(表7、8)。

3年間の食中毒21事例で検出されたNVのgenogroupはG1とG2重複が5事例、G2のみが16事例であり、ほとんどがG2であった。

D. 考察

輸入生鮮食品はRT-PCRでは3検体でNVG1が検出されたのみであるが、Real time PCRでは16検体11.3%がNVに汚染されていることが示さ

れた。RT-PCRとReal time PCRの結果が不一致であったのは検出感度がRT-PCRよりReal time PCRの方が高かったためと考えられた。

輸入生鮮食品はNVが検出されていた16検体のうち13検体(81.3%)は10月から2月に検出され、これは感染性胃腸炎の発生する時期と一致していた。このことは中国や韓国など輸出国でのNV流行により、生鮮食品がウイルスに汚染された可能性を示している。これら汚染された食品による食中毒発生の危険があると考えられた。

食中毒発生事例では調理従事者からNVが検出された事例が8事例(38.1%)あったことから、調理従事者が食品を汚染したことにより食中毒が発生した可能性を示している。調理従事者には手洗いの励行や調理用手袋の着用など食中毒発生予防のための注意を喚起する必要があると思われた。魚介類が原因食品と考えられた事例は14事例(66.7%)あったが、原因食品が不明な事例もあり、今後、魚介類以外の食品についてウイルス粒子の精製、濃縮法を検討し、原因食品の判明につとめることが重要であると考えられた。また感染経路の解明のためにも同ロットの食品を検査する必要がある、飲食店等では食品を確保しておく必要があると考えられた。

E. まとめ

輸入生鮮食品についてウイルスによる汚染状況を調べたためにNVおよびHAV遺伝子の検

出を行った。平成13年8月から平成16年2月の142検体中16検体(11.2%)がNVに汚染されていることが示された。生鮮食品からNVが検出された時期は10月から2月が全体の約80%を占めていた。検出されたNVのgenogroupはG1とG2の重複が2検体、G1が10検体、G2が4検体でG1が多かった。

平成13年10月から平成16年2月の間に神奈川県域で発生した食中毒21事例はすべてNVが原因であり、検出されたNVのgenogroupはG1とG2重複が5事例、G2のみが16事例であり、そのほとんどがG2であった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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

2. 学会発表

- 1) 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、横浜市、2003.
- 2) 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、京都、2003.
- 3) 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、京都、2003.

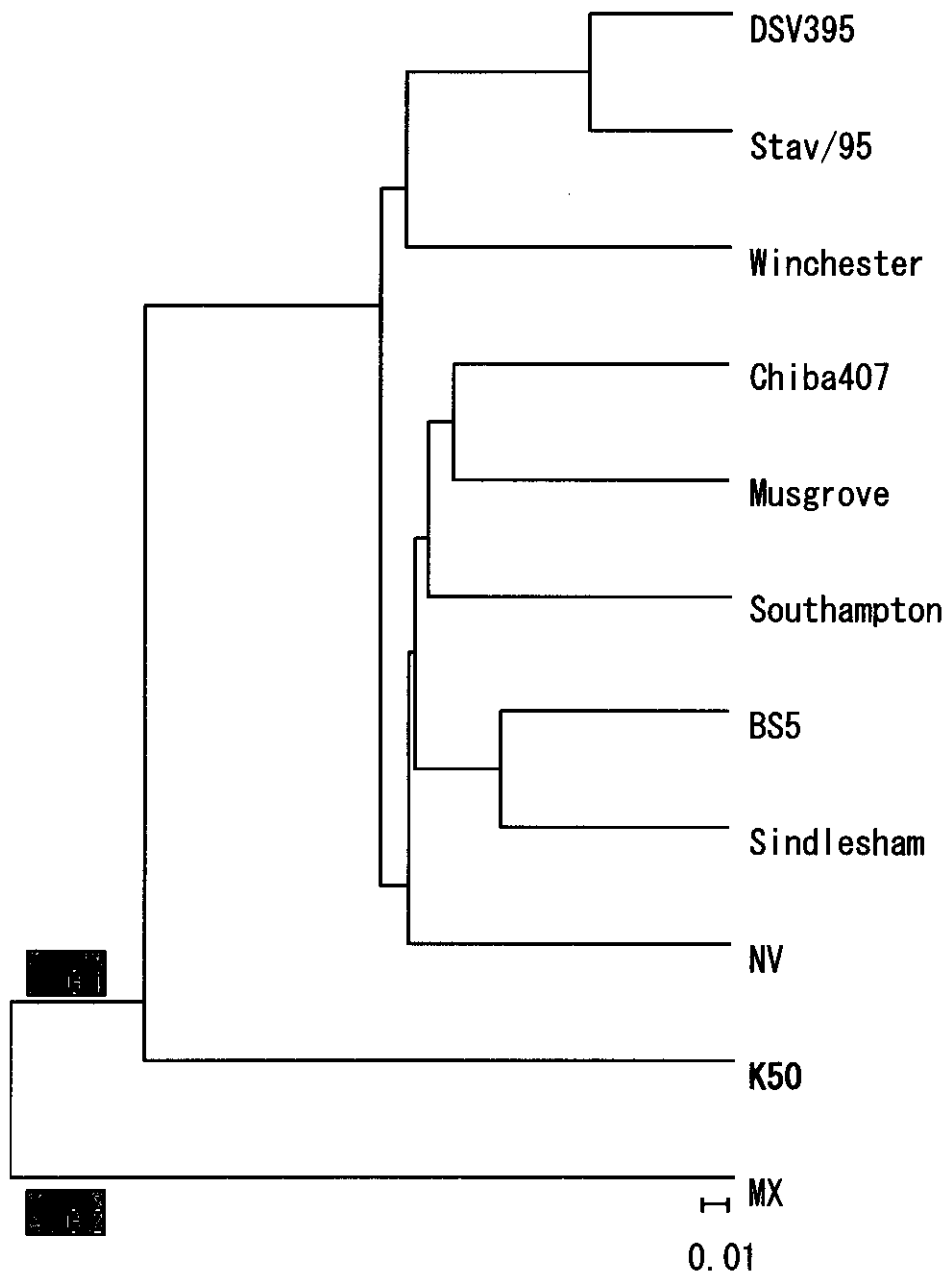


図1 韓国産ハマグリ（検体番号：K50）から検出されたノロウイルスの分子系統樹

表1 平成13～15年度輸入食品月別汚染状況

月	原産国	種類	検体数	陽性数	Real Time PCR*		
					NV		HAV
					G1	G2	
4月	中国	アカガイ	1	0	0	0	0
		ハマグリ	1	1	428	0	0
	韓国	タイラガイ	1	0	0	0	0
	インドネシア	ブラックタイガー	1	0	0	0	0
	タスマニア	カキ	1	0	0	0	0
5月	中国	アカガイ	1	0	0	0	0
		ハマグリ	1	0	0	0	0
	韓国	タイラガイ	1	1	438	0	0
	インド	ブラックタイガー	1	0	0	0	0
	ミャンマー	ブラックタイガー	1	0	0	0	0
6月	中国	アカガイ	1	0	0	0	0
		ハマグリ	1	0	0	0	0
	韓国	タイラガイ	1	0	0	0	0
	タスマニア	カキ	1	0	0	0	0
	インドネシア	ブラックタイガー	1	0	0	0	0
7月	中国	アカガイ	2	1	929	0	0
		ハマグリ	1	0	0	0	0
	北朝鮮	ハマグリ	1	0	0	0	0
	タスマニア	カキ	1	0	0	0	0
8月	中国	アカガイ	6	0	0	0	0
		ハマグリ	8	0	0	0	0
9月	中国	アカガイ	4	0	0	0	0
		ハマグリ	4	0	0	0	0
	韓国	アカガイ	2	0	0	0	0
	北朝鮮	タイラガイ	1	0	0	0	0
		アカガイ	1	0	0	0	0
アメリカ	カキ	2	0	0	0	0	
10月	中国	アカガイ	4	2	821	4019	0
		ハマグリ	6	1	8185	0	0
	韓国	タイラガイ	1	0	0	0	0
	北朝鮮	アカガイ	1	0	0	0	0
		ハマグリ	1	0	0	0	0
アメリカ	カキ	2	0	0	0	0	
11月	中国	アカガイ	5	0	0	0	0
		ハマグリ	6	0	0	0	0
	韓国	アカガイ	2	0	0	0	0
		タイラガイ	2	0	0	0	0
	北朝鮮	ハマグリ	4	0	0	0	0
	インドネシア	ブラックタイガー	1	0	0	0	0
	フィリピン	ブラックタイガー	1	0	0	0	0
ミャンマー	ブラックタイガー	1	0	0	0	0	
12月	中国	アカガイ	4	1	212	0	0
		ハマグリ	4	0	0	0	0
	韓国	アカガイ	3	1	767	0	0
		タイラガイ	1	1	201	0	0
	インドネシア	ムールガイ	1	0	0	0	0
北朝鮮	ハマグリ	2	0	0	0	0	
1月	中国	アカガイ	5	0	0	0	0
		ハマグリ	6	0	0	0	0
		タイラガイ	1	1	6828*	7129*	0
	韓国	アカガイ	5	2	556,692*	279*	0
		タイラガイ	2	0	0	0	0
北朝鮮	ハマグリ	3	0	0	0	0	
フィリピン	ブラックタイガー	1	1	0	235	0	
2月	中国	カキフライ	1	1	115	0	0
		アカガイ	1	0	0	0	0
		ハマグリ	2	0	0	0	0
	韓国	アカガイ	4	0	0	0	0
		タイラガイ	3	1	0	4292	0
	北朝鮮	ハマグリ	4	1	0	211	0
インドネシア	キングエビ	1	0	0	0	0	
合計			142	16	12	6	0

*: 結果は中腸線1gあたりのコピー数を示す

☆: 同一の貝からG1、G2共に検出された

表2 平成13～15年度輸入食品国別汚染状況

原産国	種類	検体数	陽性数	Real Time PCR*		
				NV		HAV
				G1	G2	
中国	アカガイ	34	4	929,212,821	4019	0
	ハマグリ	40	2	428,8185	0	0
	タイラガイ	1	1	6628 [☆]	7129 [☆]	0
	カキフライ	1	1	115	0	0
韓国	アカガイ	16	3	767,556,692 [☆]	279 [☆]	0
	タイラガイ	13	3	201,438	4292	0
	ムールガイ	1	0	0	0	0
北朝鮮	アカガイ	3	0	0	0	0
	ハマグリ	16	1	0	211	0
インド	ブラックタイガー	1	0	0	0	0
インドネシア	ブラックタイガー	4	0	0	0	0
	キングエビ	1	0	0	0	0
ミャンマー	ブラックタイガー	2	0	0	0	0
フィリッピン	ブラックタイガー	2	1	0	235	0
アメリカ	カキ	4	0	0	0	0
タスマニア	カキ	3	0	0	0	0
	合計	142	16	12	6	0

*: 結果は中腸線1gあたりのコピー数を示す

☆: 同一の貝からG1、G2共に検出された

表3 平成13年度食中毒発生状況

事例番号	発生年月日	発生地	原因施設	原因食品	発病者数/喫食者数
1	2001.1.20	大和市	寿司店	カキ	8/10
2	2001.1.22	南足柄市	飲食店	アサリ、甘エビ	26/123
3	2001.4.11	小田原市	飲食店	イカ塩辛	36/112
4	2002.2.1	厚木市	不明	不明	16/34
5	2002.2.3	藤沢市	寿司店	カキ	13/18
6	2002.2.3	藤沢市	レストラン	カキ	39/64
7	2002.2.12	厚木市	寿司店	カキ	6/16
8	2002.2.22	厚木市	飲食店	カキ	8/20
9	2002.2.24	茅ヶ崎市	飲食店	帆立稚貝	4/16

表4 平成13年度食中毒事例検査結果

事例番号	検体名	検体数	RT-PCR 陽性数	ハイブリ ダイゼイ ション 陽性数	NV 型
1	患者便	4	2	2	G1, G2
	従事者便	3	0		
2	患者便	18	13	9	G2
	従事者便	7	0		
3	患者便	16	11	8	G2
	従事者便	19	1	1	G2
	塩辛	5	3	3	G1,G2
4	患者便	5	4	4	G2
	従事者便	2	0		
5	患者便	12	6	6	G2
	従事者便	4	0		
6	患者便	17	11	9	G1,G2
	従事者便	2	1	1	G1
7	患者便	3	2	2	G2
	カキ(別ロット)	1	0		
8	患者便	6	3	1	G2
	従事者便	4	0		
	カキ(別ロット)	1	0		
9	患者便	7	4	4	G2
	従事者便	10	0		
	ホタテ	1	0		

表5 平成14年度食中毒発生状況

事例番号	発生年月日	発生地	原因施設	原因食品	発病者数/喫食者数
1	2002.10.25	小田原市	病院	不明	107/506
2	2002.11.25	秦野市	小売店	力キ	4/4
3	2002.12.14	茅ヶ崎市	飲食店	力キ	7/14
4	2002.12.15	平塚市	特別養護老人ホーム	不明	35/98
5	2003.1.20	藤沢市	自宅	不明	9/11
6	2003.1.21	鎌倉市	飲食店	力キ	
7	2002.2.17	厚木市	飲食店	不明	7/70

表6 平成14年度食中毒事例検査結果

事例番号	検体名	検体数	Real time PCR 陽性数	NV 型
1	患者便	34	25	G2
	従事者便	30	7	G2
2	患者便	2	2	G2
	従事者便	6	0	
	食品	2	0	
3	患者便	12	9	G2
	従事者便	28	0	
	食品	6	0	
4	患者便	11	8	G2
	患者吐物	13	7	G2
	従事者便	14	3	G2
5	患者便	4	4	G2
	従事者便	11	3	G1,G2*
6	患者便	9	9	G2
	従事者便	2	0	
7	患者便	3	3	G2
	従事者便	13	3	G2

*G1陽性数:1、 G2陽性数:2

表7 平成15年度食中毒発生状況

事例番号	発生年月日	発生地	原因施設	原因食品	発病者数/喫食者数
1	2003.12.6	足柄上市	飲食店	カキ	26/46
2	2003.12.14	藤沢市	飲食店	カキ	6/11
3	2003.12.16	厚木市	仕出し弁当店	弁当	13/59
4	2004.1.8	平塚市	給食センター	弁当	14/48
5	2004.2.6	厚木市	飲食店	ハマグリ	7/18

表8 平成15年度食中毒事例検査結果

事例番号	検体名	検体数	Real time PCR 陽性数	NV 型
1	患者便	19	4	G1,G2*
	従事者便	7	0	
2	患者便	4	3	G2
	従事者便	2	1	
3	患者便	7	1	G2
	従事者便	23	0	
4	患者便	18	17	G2
	従事者便	15	3	
5	患者便	10	4	G2
	従事者便	12	0	

*G1陽性数:3、 G2陽性数:2

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 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

分担研究者 大瀬戸光明（愛媛県立衛生環境研究所）

協力研究者 近藤玲子、山下育孝、豊嶋千俊（同上）

研究要旨

食品のウイルス学的安全性評価の一環として、平成 13 年度から引き続いて輸入貝類のノロウイルス (NV)、A 型肝炎ウイルス (HAV) 汚染状況を調査した。今年度は平成 15 年 4 月から 16 年 3 月の 12 月間に、中国、韓国及び北朝鮮から輸入された貝類 62 例からリアルタイム PCR を用い、NV と HAV の検出を試みた。その結果、NV が 29 例 (46.8%)、HAV が 1 例 (1.6%) 検出された。NV は年間を通じて検出され、NV 検出率の季節的消長はみられなかった。ほとんどの貝類の NV 含有量は少なく、リアルタイム PCR の定量限界値以下であったが、一部の検体では数百コピー/g から 80,000 コピー/g の濃厚汚染を示すものもみられた。HAV が検出されたことは、輸入貝類の微生物汚染モニタリングの重要性を示唆している。

A. 研究目的

魚介類や果実等生鮮食品を介する A 型肝炎や急性胃腸炎の食中毒事例が多数報告されている。我が国は大量の食品輸入国であるため、健康危機管理対策として輸入食品の安全性の確保は重要な課題である。しかし、食品のウイルス学的安全性の評価は最近までほとんどなされていない。

本研究は、統一したウイルス検査方法を用いて、輸入食品のウイルス汚染状況の実態を把握し、健康被害対策に資することを目的としており、平成 13 年度から継続して、輸入貝類からの NV 及び HAV の検出を行った。

B. 研究方法

検査材料:平成 15 年 4 月から 16 年 3 月の間に、愛知県北部市場に搬入された輸入貝類を買上げた 62 ロットを用いた。貝類は各ロットにつき中腸腺約 1g を 1 検体とし、各ロットにつき 3

検体を検査に供した。中腸腺約 1g はアカガイでは 1 個、ハマグリでは 1~6 個、シジミでは 5~20 個に相当した。また、平成 14 年 12 月から平成 15 年 3 月まで、月 2 回県内産のカキを採取したものを供試した。

貝類からのウイルスの濃縮、RNA 抽出:貝類からのウイルス濃縮は、以下のとおり行った。貝から切り出した中腸腺 1~2g を、10ml の PBS で乳剤とし、10,000 回転 20 分遠心上清を Vertrel XF 処理をし、得られた水相を 30% 蔗糖クッションに重層し、38,000rpm2 時間超遠心後、沈渣を 140ml の蒸留水に浮遊させたものを抽出材料とした。RNA 抽出には QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) を用い、添付のマニュアルに従った。

NV の検出: NV は景山らの方法に準じたリアルタイム PCR で行った。即ち、COGF/R プライマーと RING-TP タックマンプローブを用い、ABI 社のプリズム 7000 で測定した。既知

濃度 NV スタンダードは国立感染症研究所西尾治博士から分与を受けた。PCR 条件は 50°C 2 分、95°C 10 分の後、95°C 15 秒、56°C 1 分を 50 サイクルで行った。リアルタイム PCR で NV 遺伝子が検出されたものについては、nested RT-PCR を行った。1st PCR プライマーは genogroup 1(G1) 用として COG1F/G1SKR を、genogroup 2(G2) 用として COG2F/G2SKF を用い、nested PCR プライマーは COGF/R 及び SKF/R を用いた。

HAV 遺伝子検出：HAV 検出にはリアルタイム PCR は西尾が設定した HAV449 プライマーと HAV557 プライマーを用いたタックマンプローブ法で行った。既知濃度 HAV スタンダードは国立感染症研究所西尾治博士から分与を受けた。リアルタイム PCR で HAV 陽性検体は、戸塚らのプライマー HAV2799/3273 及び HAV2907/3162 を用いた nested RT-PCR を行った。

C. 研究結果

1) 輸入貝類からのウイルス検出状況

平成 15 年 4 月から 16 年 3 月の間に購入された輸入貝類計 62 ロット (186 検体) について、リアルタイム PCR を実施した (表 1)。輸入国別では、中国産はハマグリ 27 ロット、アカガイ 16 ロット、シジミ 2 ロットの計 45 ロットで、韓国産はアカガイ 10 ロット、アサリ 1 ロットの計 11 ロット、北朝鮮産がアカガイ 6 ロットであった。

リアルタイム PCR による NV と HAV 遺伝子の検出結果を表 2 に示した。リアルタイム PCR で NV が検出された検体は 29 ロット (検出率 46.8.0%) で、輸入貝類が比較的高率に NV を保有している状況が示された。中国産では 21 ロット (46.7%)、韓国産では 5 ロット (45.5%)、北朝鮮産では 3 ロット (50%) から NV が検出された。貝の種類別にはアカガイ 18 ロット (56.3%)、ハマグリ 9 ロット (33.3%) から NV が検出された。その他に、アサリとシジミ

各 1 ロットからそれぞれ NV が検出され、ハマグリに比べアカガイの NV 汚染が多い傾向がみられた。検出された NV の遺伝子型は、G1 が 13 例、G2 が 19 例で、そのうち G1 と G2 重複例が 3 例あった。

調査期間を通じてリアルタイム PCR で HAV が 1 ロット陽性であった。しかし、RT-PCR では陰性であった。この検体は 10 月に採取された韓国産アカガイで、同時に NV (G1) も陽性であった。

図 2 には輸入貝類からのウイルス検出状況を、月別に示した。NV は平成 15 年 4 月から 16 年 3 月まで、毎月検出された。また、検出率の季節による特徴的消長はみられなかった。

表 3 にはリアルタイム PCR で NV 陽性の 29 ロット、39 検体 (G1 陽性 18 例、G2 陽性 27 例) についてテストチューブ当たり (cDNA 4 μ l) の NV コピー数の分布と RT-PCR の検査結果を示した。リアルタイム PCR で得られたウイルス copy 数は、ほとんど 10 コピー未満で、リアルタイム PCR で再現性良く定量可能な 100 コピー以上を示したのは 1 例のみであった。また、リアルタイム PCR 陽性例のうち、nested RT-PCR で陽性となったのは、G1 で 6 例、G2 で 10 例に過ぎなかった。これらのことは輸入貝類のウイルス汚染率は比較的高いが、多くの NV 陽性貝に含まれているウイルス量は微量であったことを示唆している。

2) 愛媛県産カキからのウイルス検出状況

平成 15 年 11 月下旬から 15 年 2 月までの間、県内のカキ養殖場 3 か所から毎月 2 回ずつ採取し、リアルタイム PCR で NV の検出を試みた。その結果は表 4 に示したとおり、1 月上旬に I 地点と N 地点採取カキから NV が検出され、次いで 2 月上旬の N 地点、2 月下旬の I 地点採取カキが NV 陽性であった。NV 陽性であった 4 例のうち、2 月下旬採取のカキから検出された NV ウイルスコピー数/個は G1 が 2.3×10^5 、G2 が 10 で、著しく多かった。しかし、同ロット

トの 2 検体は陰性であった。また、他の 3 ロットの NV 陽性例は、すべて定量限界値以下でウイルス濃度は非常に低かった。同一のカキ養殖場でもカキ個々の NV 汚染状況は均一ではないことが示された。

D. 考 察

2002 年には輸入貝（ウチムラサキ）を摂食し約 1 か月後に A 型肝炎の集団発生を起こした事例が 2 回報告された。これらの 2 事例ともに、貝の摂食 2 日後に NV による急性胃腸炎集団発生を起こしており、貝が糞便汚染を受ける環境にあったことが推測された。これらの事例が発生したため、特に魚介類のウイルス学的安全性を評価し、安全性の基準を定める必要性が高まっている。食品の安全性を判断するためには、より高感度で定量の精度の高いウイルス検出法が必要とされる。

最近新しいプライマー、プローブを用いた NV 検出リアルタイム PCR が開発され、高い評価を得ている。輸入貝類のウイルスによる汚染状況を把握するため、平成 13 年度から引き続き、国立感染症研究所を中心とした地方衛生研究所等との業務分担体制のもと、NV 及び HAV を定量的に検出するため、リアルタイム PCR を実施した。平成 15 年度は中国、韓国及び北朝鮮から輸入された 62 ロットの貝類の検査を行った。結果は昨年度の NV 検出率 30% に比べると、今年度は 47% で、輸入貝類の NV 汚染が高頻度であったことが示された。輸入国別、貝の種類別の検査数が一定していないため、輸入国及び貝の種類による NV 汚染率を比較するのは難しいが、中国産アカガイの NV 陽性率が 69% に比べ、中国産ハマグリが 33% で、アカガイの汚染率が高い傾向がみられた。また、輸入貝類からの NV 検出は、年間を通じてあり、寒冷期に多いという季節的消長は観察されなかった。なお、今年度の輸入貝類はすべて養殖貝であった。

HAV は韓国産赤貝から 1 例のみ検出された。

最近わが国では、A 型肝炎のほとんどは国内感染であるとされているが、国内での HAV 常在流行はみられておらず、輸入貝類による HAV 持込が一定の役割を果たしていることが推測される。A 型肝炎の潜伏期は約 1 ヶ月と長いとため、原因食材の究明は困難である。A 型肝炎の予防には、貝類の HAV 汚染モニタリングが高い精度で行えれば極めて有効と考えられる。そのためリアルタイム PCR、RT-PCR の検出限界、検出可能なウイルス株の範囲等を明確に示し、プライマー、プローブの有効性を評価する必要があると思われた。

NV のリアルタイム PCR は、反応チューブに 1copy の cDNA がはいておれば、ほぼ検出可能なレベルにあると思われる。従って、さらに高感度のウイルス検出には、食品からのウイルス粒子の精製、濃縮法や、ウイルス RNA 抽出法の段階が大きく影響すると考えられる。また、混入している微量のインヒビターの影響についても検討することが必要である。

また、貝類の養殖海域でのウイルス汚染様式を考えると、PCR 等で検出可能なレベル以上のウイルス保有貝が検出される海域では、検出限界以下のウイルスを保有する貝がその数十倍、数百倍生産されていることが推測される。そのため、出荷される段階の貝を個々に検査して安全性を評価することは非常に困難であると思われる。養殖海域の海水、底層の土砂等のウイルス量を継続的にモニタリングする方法の開発が望まれる。

E. まとめ

輸入貝類のウイルス汚染状況を把握するため、リアルタイム PCR による NV 及び HAV 遺伝子の検出を行った。

平成 15 年 4 月から 16 年 3 月の間に 62 ロットの輸入貝類を検査し、NV を 29 ロット（検出率 46.8%）、HAV を 1 ロット（1.6%）から検出した。

NV は年間を通じ検出され、季節的な消長はみられなかった。また、アカガイの NV 検出率は 56.3%、ハマグリは 33.3%であった。

NV の遺伝型の分布は、G1 が 13 例に対し G2 が 19 例で、G2 の割合が多かった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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)

2. 学会発表

1) 西田知子、野田衛、三上稔之、篠原美代子、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、京都市、2003 年 10 月.

2) 杉枝正明、古屋由美子、大瀬戸光明、藤本嗣人、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、京都市、2003 年 10 月.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 平成15年度月別・輸入国別の検査数(貝類ロット数)

国名	種類別	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	計
中国	アカガイ	2	2	3	1	3			2	3	3	2	1	22
	ハマグリ	2	1		2		2	1	3	3	2	2	3	21
	シジミ							1				1		2
韓国	アカガイ	1	1	1	1	1	2	2					1	10
	アサリ		1											1
北朝鮮	アカガイ			1	1	1	1	1	1					6
計		5	5	5	5	5	5	5	6	6	5	5	5	62

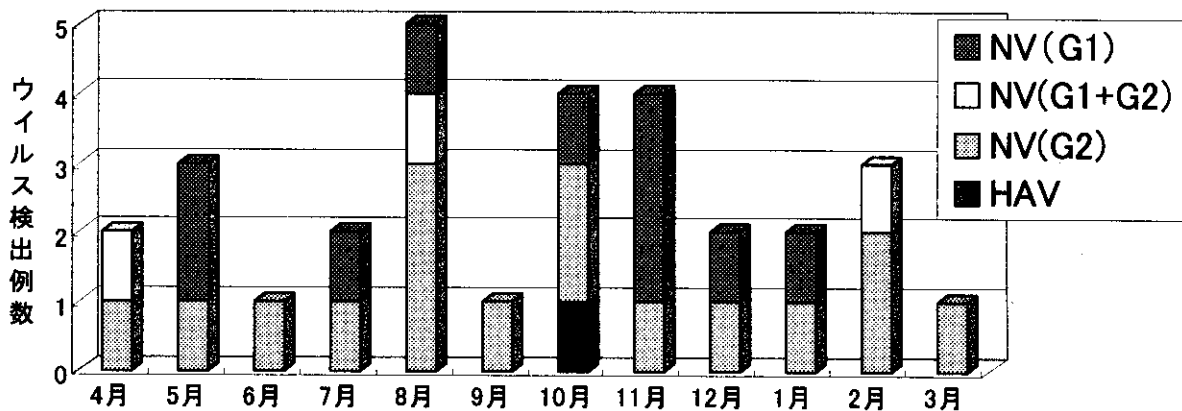


図1 平成15年度輸入貝類からの月別ウイルス検出状況

表2 輸入国別・種類別ウイルス検出状況

国名	種類別	検査例数	NV Real Time		NV 陽性数	HAV Real Time	HAV 陽性数
			G I	G II			
中国	アカガイ	16	6	5	11		
	ハマグリ	27	2	8	9		
	シジミ	2	1	1	1		
韓国	アカガイ	10	2	3	4	1	1
	アサリ	1		1	1		
北朝鮮	アカガイ	6	2	1	3		
計		62	13	19	29	1	1

表3 Real Time PCR陽性例のコピー数の分布及びRT-PCR

copy数/4 μ l/test	G1陽性	RT-PCR 陽性	G2陽性	RT-PCR 陽性
<1	9	4	10	2
$\geq 1 \sim < 3.2$	5	1	10	5
$\geq 3.2 \sim < 10$	4	1	4	1
$\geq 10 \sim < 32$				
$\geq 32 \sim < 100$			2	1
≥ 100			1	1
計	18	6	27	10

表4 愛媛県産カキのウイルス検査結果

採取月日	採取地点			陽性例copy数/個
	I	N	K	
平成15年11月18日	-	0/3	0/3	
平成15年12月2日	0/3	0/3	0/3	
平成15年12月16日	0/3	0/3	0/3	
平成16年1月6日	3/3	1/3	0/3	I: G2 22.5 N: G1 27.5, G2 20
平成16年1月20日	0/3	0/3	0/3	
平成16年2月3日	0/3	1/3	0/3	N: G2 10
平成16年2月17日	1/3	0/3	0/3	I: G1 2.3×10^5 G2 10
計	4/21	2/24	0/24	

平成 15 年度厚生科学研究費補助金(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: 輸入食品のウイルス汚染状況調査・研究

分担研究者 杉枝正明 (静岡県環境衛生科学研究所、微生物部)
研究協力者 田中俊光 (千葉市環境保健研究所)

研究要旨

輸入食品の安全性の評価を行うため、本年度も継続して輸入魚介類から RT-PCR 法およびリアルタイム PCR 法でノロウイルス(NV)、A型肝炎ウイルス (HAV)、E型肝炎ウイルス (HEV) の検出を試みた。

2003 年 4 月～2004 年 3 月の期間に、中国、韓国、北朝鮮、ベトナム、フィリピン、インドネシア、ロシアなどの 7ヶ国から輸入された赤貝、ハマグリ、タイラ貝、ブラックタイガーなどの 4 種類の魚介類、計 60 検体について行った。赤貝、タイラ貝、ブラックタイガーの 3 検体 (5.0%) から NV が検出されたが、HAV、HEV は陰性であった。これまでの調査年次で最も汚染状況が低かった。

また、2003 年 8 月～2004 年 1 月の期間に、県内産の市販豚レバー 10 検体、野生鹿 9 検体の HEV 汚染について、RT-PCR 法で検出を試みたが検出はされず、地域差、調査対象数などを検討し、詳細把握していきたい。

また、ヒトにおける流行期以外の NV 汚染の実態を把握するため、2003 年 8 月～2004 年 2 月の期間に、県内の一地域の健康者 (調理調理者)、小児胃腸炎患者からの NV 検出を試みた。その結果、10 月の小児胃腸炎患者から県内の集団事例患者糞便から検出された遺伝子型と同様な NV 遺伝子が確認された。NV が冬季流行シーズン前に小児科領域の胃腸炎患者から確認されたことは、地域における食中毒、感染症の健康被害を防止する情報提供の資料として活用できるものと考えられる。

A. 研究目的

近年、食への安全性が注目されているが、病原微生物 (ウイルス、細菌) による健康被害の実態把握は未だに解決されていない場合が多く、不明な点が多い。

平成 13 年度からこの詳細を把握するため輸入食品中のウイルス汚染などに関し、

本研究班が調査を実施している。

本年度も輸入食品中の NV、HAV、HEV 汚染の実態を調査した。

また、国内で HEV 患者が確認され、その感染源として野生鹿が報告されたことから、県内捕獲された野生鹿および養殖ブ

タからの検出を行った。

さらに NV による健康被害は季節集中性が認められているが、冬季以外の感染実態は十分でないことから、夏季から流行期の期間に健康者、小児胃腸炎患者からの NV 検出を試みた。

B. 研究方法

検査材料：輸入魚介類から調査は、2003 年 4 月～2004 年 3 月の期間に、千葉市内に輸入された赤貝 23 件、ハマグリ 25 件、タイラ貝 8 件、ブラックタイガー 4 件、計 60 検体の各腸内容を検査対象とした。

また、市販豚レバーは県内産のトレー包装の 10 件、野生鹿は冷凍保存されていた肉 2 件と狩猟後の肝臓 7 件を 2003 年 8 月～2004 年 2 月の期間に採取したものを用いた。

また、2003 年 8 月～2004 年 2 月の期間に、10 ヶ所の食品営業施設の調理関係者（毎月 1 回、同一の健康者 50 名）糞便 342 件、小児胃腸炎患者糞便は、保護者の同意を得られた 154 件を検査対象とした。

各検査材料の前処理、RNA 抽出は、本研究班のマニュアルに従って実施した。

NV の検出に使用したプライマーはキャプシド領域を増幅する G I /G II -COG/FR、G I /G II -SK/FR を用い RT-PCR を行った。

HAV の検出に使用したプライマーは、本研究班の主任研究者（西尾ら）が設定した HAV+2795/HAV-3351 (1st PCR)、HAV+2903/HAV-3296 (Nested PCR) で行った。

HEV の検出に使用したプライマーは、

2002 年に Sonia らが報告している 5687d/6417R (1st PCR)、5972d/6319Rd (Nested PCR) で行った。既知陽性サンプル（ブタ由来株）は、独立法人農業・生物系特定産業技術機構、動物衛生研究所、感染症研究部の宮崎斐子先生から分与を受けた。

リアルタイム PCR 法での NV、HAV の検出は、cDNA を作成し、国立感染症研究所（西尾治、研究班主任研究者）に依頼すると共に検出された遺伝子産物の解析も依頼した。

C. 研究結果

1) 輸入魚介類からのウイルス検出状況

2003 年 4 月～2004 年 3 月の期間に、中国から赤貝 17 件、ハマグリ 21 件、韓国から赤貝 5 件、ハマグリ 1 件、タイラ貝 8 件、北朝鮮からハマグリ 3 件、ベトナムからブラックタイガー 2 件、フィリピン・インドネシアからブラックタイガー各 1 件、ロシアから赤貝の 1 件、計 60 検体のウイルス検査を実施した。（表 1）

RT-PCR 法とリアルタイム PCR 法で 60 検体中 3 検体（5.0%）から NV が検出されたが、HAV、HEV は検出されなかった。

検出された魚介類の 3 件は、1 月のインドネシア（ブラックタイガー）、2 月の韓国（タイラ貝）、中国（赤貝）から輸入されたもので、いずれも Genogroup II 型で、ウイルス量は 24（ブラックタイガー）、113（赤貝）copy/g であった。（表 2）

表1 輸入生鮮魚介類の検査材料(2003年4月～2004年3月)

産地	種類	4月	5月	6月	7月	8月	10月	12月	1月	2月	3月	計
中国	赤貝	2	2	1	2	2	1	1	1	2	3	17
	ハマグリ	2	2	2	3	2	2	2	2	2	2	21
韓国	赤貝			1		1	1	1	1			5
	タイラ貝	1	1		1		1	1	1	1	1	8
	ハマグリ									1	1	2
北朝鮮	ハマグリ			1			1		1			3
ベトナム	BT				1						1	2
フィリピン	BT							1				1
インドネシア	BT								1			1
ロシア	赤貝					1						1
計		5	5	6	7	6	6	6	7	6	7	60

BT:ブラックタイガー

表2 輸入生鮮魚介類からのウイルス検出状況

産地	種類	検査数	NV		HAV		HEV
			RT-PCR	リアルタイム PCR	RT-PCR	リアルタイム PCR	RT-PCR
			G2	G2(copy/g)			
中国	赤貝	17	1				
	ハマグリ	21					
韓国	赤貝	5					
	ハマグリ	1					
	タイラ貝	8		1(123)			
北朝鮮	ハマグリ	3					
ベトナム他	BT	5		1(24)			
ロシア	赤貝	1					