

2004-01129A

厚生労働科学研究費補助金

食品の安全性・高度化推進研究事業

ウイルス性食中毒の予防に関する研究

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 武田 直和

平成17(2005)年4月

目 次

I. 総括研究報告書

ウイルス性食中毒の予防に関する研究	武田 直和	1
-------------------------	-------------	---

II. 分担研究報告書

1. 定量的リスクアセスメントモデルの評価	春日 文子	9
2. 野生イノシシから検出された HEV genotype III の解析 ー ヒト散发性急性 E 型肝炎との関連性についての考察 ー	田中 智之	17
3. 愛知県南設楽郡で捕獲されたイノシシ、シカの HEV 遺伝子検出状況と 当該地区を猟場とする猟師の HEV 抗体保有状況	榮 賢司	27
4. E 型肝炎ウイルス実験感染豚臓器中のウイルス量	恒光 裕	33
5. 家畜の抗体調査と汚染実態調査	有川 二郎	37
6. E 型肝炎ウイルスの除去に関する研究	宮村 達男	41
7. 食品のウイルス汚染状況に関する研究	西尾 治	43
8. 下水処理場におけるノロウイルスの消長	西尾 治	53
9. カキ養殖海域のウイルス汚染について	西尾 治	59
10. 群馬県における感染性胃腸炎患者とシジミ (<i>Corbicula japonica</i>) から検出されたノロウイルスの分子疫学に関する研究	西尾 治	69
11. 合成 siRNA による HAV の増殖抑制	米山 徹夫	75

12. Sapovirus (SaV) 中空粒子の作成と抗原検出 ELISA の構築	片山 和彦	81
13. 3型E型肝炎ウイルス構造蛋白の発現	李 天成	91
14. ノロウイルス感染のリスクアナリシスの為の リスクプロファイル	西尾 治	95
Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧		108
Ⅳ. 研究成果の刊行物・別冊		111

厚生労働科学研究費補助金
食品の安全性・高度化推進研究事業

ウイルス性食中毒の予防に関する研究

平成 16 年度 総括研究報告書

主任研究者 武田 直和

平成 17 (2005) 年 4 月

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進研究事業）
総括研究報告書

ウイルス性食中毒の予防に関する研究

主任研究者 武田 直和 国立感染症研究所 ウイルス第二部第一室長

研究要旨 和歌山県では野生イノシシから採取した血液 16 検体中 2 検体から HEV（E 型肝炎ウイルス）IgG 抗体が、1 頭のイノシシの肝臓、血液から 3 型 HEV 遺伝子が検出された。散発性急性 E 型肝炎症例が報告され、3 型 HEV 遺伝子が検出されたが、野生イノシシとの間には明確な接点は認められなかった。愛知県ではイノシシ 91 頭中 25 頭が HEV 抗体陽性、カモシカ 19 頭、シカ 13 頭は全て抗体陰性であった。イノシシ 91 頭中 11 頭から 4 型 HEV 遺伝子が検出された。猟師とその家族の HEV 抗体保有状況と肝機能検査を実施したが、狩猟した動物からの感染の可能性は低いと思われた。日本シカ、エゾジカ、合計 250 検体で抗体陽性のものはなかった。エゾジカの肝臓・直腸糞・胆汁からウイルス遺伝子は全く検出されなかった。3 型遺伝子をもつ HEV の ORF2 全長を発現することによって、直径 35-38nm のネイティブなウイルス粒子とほぼ同じ直径を有する中空粒子を作製することができた。プラノバ 20N カラムでのこの粒子の除去効率は 99.9%以上であった。豚を用いた HEV 感染実験から、HEV は感染後 2-4 週において最も多量に肝臓ならびに腸管中に含まれること、少なくとも感染後 7 週まではこれら臓器中からウイルスが検出される場合があることが明らかとなった。また、HEV は肝臓だけでなく、腸管でも増殖している可能性が示唆された。

今回調査したカキ養殖海域にカキからはノロウイルス（NoV）、および A 型肝炎ウイルス（HAV）は検出されなかった。冬季の海水から NoV が検出される例があった。海域に流入する下水は、処理施設によって NoV の除去効果が異なっていた。感染性胃腸炎とシジミの関係をしらべたところ、患者とシジミ由来 NoV には疫学的な関連性があることが示唆された。下水処理場での流入下水を遠心上清と沈渣に分離し、それぞれから NV 遺伝子の検出を行った結果、上清から検出された遺伝子数が圧倒的に多かった。下水処理水中における NV 遺伝子の定量検出結果から、NoV による感染性胃腸炎の流行規模や期間は、年によって異なることが推察された。また、下水処理水から NoV 遺伝子が検出されたことにより、従来の下水処理法であるオキシデーションディッチ法では十分に除去できないことが明らかになった。わが国の生食用カキでは 12 月から NoV が検出され、1 月は 24%と高い汚染率であった。市販カキの NoV 汚染量は様々であり、ウイルス学的に安全とする検査個数の特定をしなければならない。韓国、中国、ロシアからの輸入生鮮魚介類では NoV 陽性が 18%に見られた。HAV は全ての食品で汚染は認められなかった。

HAV の塩基配列に特異的な siRNA の増殖抑制効果を検討したところ、ウイルス構造蛋白領域を標的にした siRNA が最も効率よく HAV の増殖を抑制した。組換えバキュロウイルス発現系を用いたサポウイルス（SaV）GI、GII、GV クラスターの VLPs の発現に成功し、ポリクローナル抗体を用いたサンドイッチ抗原 ELISA システムを構築した。

米国 FDA および EC 科学委員会によって行われた微生物学的リスクアセスメントの事例について内容を調査した。NoV のリスクプロファイルを作成した。

分担研究者		有川 二郎	北海道大学
春日 文子	国立医薬品食品衛生研究所	宮村 達男	国立感染症研究所
田中 智之	堺市衛生研究所	西尾 治	同上
榮 賢司	愛知県衛生研究所	米山 徹夫	同上
恒光 裕	動物衛生研究所	片山 和彦	同上

李 天成	同上
協力研究者	
内野 清子	堺市衛生研究所
三好 龍也	同上
安田 祐子	和歌山労災病院
原 猛	同上
藤浦 明	愛知県衛生研究所
山下 照夫	同上
伊藤 雅	同上
石山 登	同上
池田 秀利	動物衛生研究所
勝田 賢	同上
神山麻理子	同上
川崑 健司	同上
宮崎 綾子	同上
吉井 雅晃	同上
山口 成夫	同上
杉枝 正明	静岡県環境衛生科学研究所
倉重 英明	同上
古屋由美子	神奈川県衛生研究
片山 丘	同上
山下 育孝	愛媛県立衛生環境研究所
西田 知子	山口県環境保健研究センター
野田 衛	広島市衛生研究所
福田 伸治	広島県保健環境センター
植木 洋	宮城県保健環境センター
山木 紀彦	同上
吉澄 志磨	北海道立衛生研究所
田中 俊光	千葉市環境保健研究所
徳竹 由美	長野県環境保全研究所
秋山 美穂	国立感染症研究所
愛木 智香子	同上
木村 博一	群馬県衛生環境研究所
齋藤 美香	同上
長井 章	同上
森田 幸雄	同上
石岡 大成	同上
小澤 邦壽	同上
下池 貴志	国立感染症研究所
清原 知子	同上
佐藤 知子	同上
戸塚 敦子	同上
岡 智一郎	同上
グラント・ハンスマン	同上
小川 智子	同上
名取 克郎	同上

A. 研究目的

食品由来ウイルス感染症は国民の食生活にとり益々脅威となってきた。ノロウイルスによる集団食中毒や A 型肝炎ウイルスによる集団急性肝炎、野生動物の生肉喫食による劇症 E 型肝炎など、ウイルスに汚染された食品が原因となった疾病が的確に捉えられるようになってきた。事件数、患者数、発生状況をつぶさに把握し、その結果を国民、行政機関、および医療関係者に迅速かつ的確に提供することは、上記の感染症を制圧する上で重要な施策のひとつである。これらの感染症の制御を困難にしている最大の理由は、現在ある検出法の検出限界を超えた、極めて微量のウイルス量で感染が成立することである。このため、二枚貝とノロウイルス、二枚貝と A 型肝炎ウイルスの組合せ以外は原因食品や原因物質を特定することが極めて困難な状況にある。食品由来ウイルス感染症からは、上記の三つのウイルスが緊急度、重要度の点で突出している。いずれも RNA を遺伝子にもつウイルスであるが、これらを効率よく、かつ厳密に区別する必要もある。また、これらの感染症の制圧には、原因となった食品が汚染されるまでのウイルスの伝播経路を明らかにする必要がある。

本研究では以下を研究目的とする。

(1) 原因食品からのウイルス検出では遺伝子増幅による定量法を確立するとともに、免疫学的手法を用いた濃縮法を導入し、検出効率の向上を目指す。

(2) 食品や環境からのウイルス検出を行うことによって汚染実態調査を行う。

(3) 個々のウイルスについてその発症ウイルス量を把握するため感染実験モデルを構築する。

(4) マーカー遺伝子を人工的に導入した組換え粒子を作製し、ウイルス不活化の条件を検討する。

(5) 以上の結果を総合的に解析し定量的リスクアセスメントモデルを構築する。

本研究はウイルス遺伝子の定量的な検出を通して食品由来ウイルス感染症の制圧に直接かかわることが期待でき、国民の食生活の安全確保に大きく貢献できる。

B. 研究方法

(1) 血清および臓器の収集

散発性急性 E 型肝炎患者から血清を採取した。同時に既往歴、食事歴等の聞き取り調査を行なった。また、イノシシ、シカ、ブタ、ドブネズミ、クマネズミから血清、便、肝臓等を採取した。

(2) 抗体検出 ELISA

E 型肝炎検査マニュアル（地方衛生研究所全国協議会、国立感染症研究監修）に従い、精製した HEV 中空粒子（VLPs）を抗原として 98 穴マイクロプレートにコーティングし、動物血清をこのマイクロプレート上で 2 倍段階希釈した。基質 OPD の吸光度を測定し、カットオフ値を示す最高希釈倍数の逆数を血清抗体価とした。抗体保有率の測定には被検血清は 200 倍希釈して使用した。血清材料で非特異反応が確認されたものは、抗原固相化ウエルと抗原非固相化ウエルの両方を用い、両者の OD 値の差を正味の OD 値として表した。

(3) RT-PCR による HEV 遺伝子の増幅

E 型肝炎検査マニュアルに従い HEV 遺伝子の検出を行った。First PCR には HEV-F1 および HEV-R2 プライマーを、Second PCR には HEV-F2 および HEV-R1 を用いた。PCR 産物は Second PCR 後に 1.5% アガロースゲルにて電気泳動を行い、常法によりエチジウムブロマイド染色後に増幅断片の移動度を陽性対照と比較した。

(4) 組換えバキュロウイルスを用いた HEV VLPs の作製

構造蛋白領域 ORF2 戦領域、あるいは N 末端から 111 アミノ酸を欠失した領域を RT-PCR 法で増幅し、常法どおり組換えバキュロウイルスを作製した。Tn5 細胞に感染後、電気泳動による 54K 蛋白の確認と電子顕微鏡による中空ウイルス粒子の観察によって VLPs の発現を調べた。VLPs は濃縮・精製後ウサギで抗血清を作製した。

(5) HEV 検出蛍光抗体法

HEV 遺伝子陽性の野生イノシシ肝臓凍結切片を用いて HEV 抗原の局在を検討した。凍結切片は直ちに冷アセトンにて 15 分間固定した。その後 PBS にてリンスし、HEV モノクローナル抗体 MAb133 培養上清を一次抗体として 37℃、一時間反応させた。PBS にて洗浄後、二次抗体として FITC-標識 anti-Mouse IgG にて、37℃、30 分反応させた。PBS にて洗浄後封入し、蛍光顕微鏡で観察した。

(6) ブタを用いた HEV 感染実験

妊娠末期豚の子宮摘出により入手した、生後 3-30 日齢のノトバイオト子豚をビニールアイソレーター内で飼育した。これらに豚由来 3 型 HEV Highland 株静脈内投与し、ウイルス投与後 1 週より 1 週間隔で最長 7 週まで主要臓器等を採取した。採取した臓器、小腸内容（SIC）、大腸内容（LIC）、胆汁および尿に含まれる HEV RNA を TaqMan MGB プローブ法により定量した。

(7) siRNA による HAV 増殖抑制

HAV ゲノム上に標的を 14 箇所選んで siRNA を作製した。前日に siRNA をトランスフェクションした GL37 細胞に HAV を感染させ、7-8 日目の感染価を比較した。

(8) 組換えバキュロウイルスを用いた SaV VLPs の作製

構造蛋白質 VP2 の ATG コドンよりゲノム末端までをバキュロウイルスのトランスファーベクターに組み込み、GI クラスターの Mc114 株、GII クラスターの SakaiC12 株、GV クラスターの NK24 株の組換えバキュロウイルスを作製し、定法どおり中空粒子を得た。

(9) リスクアセスメントの調査

米国 FDA によって行われた 2 件の微生物学のおよび EC 科学委員会によるノロウイルスのリスクアセスメントについてまとめた。

(倫理面への配慮)

本研究にあたっては、試料提供者、その家族の人権、尊厳、利益が保護されるよう十分に配慮した。具体的には、各研究実施機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、また提供試料、個人情報厳格に管理、保存する。そのデータについて個人が特定されないよう配慮した。動物実験に関しては「動物の保護及び管理に関する法律」（昭和 48 年法律第 105 号）及び「実験動物の飼育及び保管に関する基準」（昭和 55 年総理府公示第 6 号）の法律及び基準の他、「大学等における実験動物について」（文部省国際学術局長通知、文学情大 141 号）の通知を踏まえつつ、動物実験が有効かつ適切に行われるよう配慮した。また感染研における動物実験指針に基づき、用いる動物の数は最小限とし、採血時には麻酔を施し動物愛護の精神のもとに実験を行った。

C. 研究結果

(1) 和歌山県の定点における HEV 汚染実態調査

イノシシから採取された血液 16 検体中、2 検体から HEV 特異的 IgG 抗体が検出された。イノシシ、シカから採取された肝臓 18 検体、血液 16 検体、筋肉 2 検体のうち、一頭のイノシシの肝臓、血液から 3 型 HEV 遺伝子が検出された。また、近隣の病院で渡航歴がなくかつ野生イノシシ、シカの生肉、生レバーの喫食歴のない 2 成人男子の散発性急性 E 型肝炎症例が報告された。急性期血清中から HEV 抗体とともに 3 型 HEV 遺伝子が検出された。

(2) 愛知県の定点における HEV 汚染実態調査

イノシシ 91 頭中 25 頭 (27.5%) が E 型肝炎の抗体を保有していたが、カモシカ 19 頭、シカ 13 頭は抗体陰性であった。また、イノシシ 91 頭中 11 頭 (12.1%) から 4 型 HEV 遺伝子が検出された。ウイルスは糞便から最も多く検出され 10 件から、血液は 5 件から検出されたが、肝臓からは検出されなかった。猟師と家族の 33 名について抗体保有状況を調査したところ、4 名が HEV 抗体を保有していた。

(3) 本州の日本シカと北海道のエゾシカの HEV 抗体保有状況調査

本州の日本シカ 150 検体、北海道のエゾシカ 100 検体調べたが、明らかな陽性例は認められなかった。また、肝臓・糞・少数例の胆汁について PCR を行ったが増幅される検体は無かった。

(4) HEV 感染実験

HEV RNA はウイルス接種後 1 週より、肝臓、胆汁、SIC、LIC、結腸、回腸等で検出された。接種後 2 週以降はほとんどの臓器ならびに血清から HEV RNA が検出された。ウイルス RNA 量はいずれの接種後週においても肝臓ならびに胆汁が最も多く、次いで、回腸、結腸、LIC 等の消化管でも多量に検出された。これら臓器中の RNA 量は接種後 2-4 週で最高値を示し、以降徐々に減少した。肝臓においては接種後 4 週で最も高値を示し、接種後 7 週においても最高値の 1/4 程度の RNA 量が検出された。一方、血清ならびに筋肉中の RNA 量はこれら臓器中の量に比べてはるかに少なく、肝臓との比較では数十~数千分の一程度の量であった。

(5) ネイティブ HEV 粒子と同じ大きさをもつ組換え中空粒子の作製とこの粒子の除去
バキュロウイルスを用いて 3 型遺伝子をもつ HEV の ORF2 全長を発現した。感染細胞内には感染 2 日目に、分子量 72k および 58k のバンドが出現した。発現は 5 日目にプラトーに達し、7~8 日目には 66k、および 54k のバンドが出現した。感染 7 日目の感染細胞上清から直径 35-38nm のネイティブなウイルス粒子とほぼ同じ直径を有する中空粒子をえた。ポアサイズが 35nm のプラノバ 35N カラムでは、この粒子の 91-95% が除去できた。一方、ポアサイズが 20nm のプラノバ 20N カラムでの除去効率は 99.9% 以上と思われた。

(6) カキ養殖海域の NoV および HAV 汚染
下水処理による NoV 除去は処理前後でほとんど減少しない場合、1000 分の一に減少する場合など、施設によって異なっていた。流入下水を遠心上清と沈渣に分離しそれぞれから NoV 遺伝子の検出を行った結果、上清から検出された遺伝子数が圧倒的に多かった。海水からの NoV 検出はリアルタイム PCR では検出できないレベルであったが、冬季に検出される例があった。HAV は全て陰性であった。カキからは検査を行った全期間において NoV、HAV ともに検出されなかった。

(7) 感染性胃腸炎とシジミ
感染性胃腸炎患者とシジミから RT-PCR 法およびリアルタイム PCR 法によって NoV を検出・定量した結果、比較的少量 ($> 10^4$ copies/g 中腸腺) の NoV ゲノムをもつシジミが検出された。ひとつのシジミから 2 つの遺伝子型が検出された例もあった。

(8) 国産生食用カキおよび輸入魚介類の NoV および HAV 汚染状況

生食用カキのうち、9 月から 11 月の間に採取したものは全て NoV および HAV 共に検出されなかった。12 月から NoV 陽性が認められ、1 月は NoV が 24% と高率に認められた。輸入魚介類では、4 月から 9 月の間に採取した検体からはウイルスは検出されなかった。しかし、10 月から NoV が検出され、検出率は 25%~60% であった。年間の平均では 18% の汚染率であった。HAV は全ての検体で陰性であった。

(9) 食中毒事件とカキの NoV 汚染量
食中毒事件あるいは有症苦情の原因とされたカキと同一海域のカキについて NoV 汚染

量を調べた。食中毒事件で明確に NoV 陽性であった 1 事件についてカキ 6 個検査したところ、1 個のコピー数が ≥ 125 に認められたにすぎなかった。他の 4 事件では ≥ 0 から < 125 コピー/個ではっきりとした陽性ではなかった。

(10) siRNA による HAV 増殖抑制

VP3 領域を標的にした siRNA が最も強い増殖抑制効果を示した。このときウイルス RNA 合成量が顕著に減少していた。5' 非翻訳領域を標的にしたものは効果を示さなかった。

(11) SaV 中空粒子の作製と抗原検出 ELISA の構築

Tn5 昆虫細胞に組換えバキョロウイルスを感染させ、培養上清に放出された VLP を超遠心操作で回収した。Mc114 株の VLP は、直径約 48nm で、表面にダビデの星と呼ばれるネイティブ SaV に特徴的な構造を有していた。GV クラスターの NK24 株もほぼ同様な特徴を示したが、粒径の異なる小型の粒子も含まれていた。GII クラスターの SakaiC12 株は、他の 2 つに比べ VLP の産出量が極端に少なかった。粒径は Mc114 とほぼ同じであった。VLP をウサギ、及びモルモットに接種して抗血清を作製した。これらを用いたサンドイッチ抗原検出 ELISA システムは、目的の抗原のみを特異的に認識し、交差反応は認められないことが示された。

(12) NoV のリスクプロファイルを作成した。

D. 考察

(1) HEV 汚染実態調査

和歌山県紀北地区で 2 年続けて同じ配列の 3 型 HEV 遺伝子がイノシシから検出され、この地区のイノシシには同じ型の HEV が恒常的に浸淫していると推測された。近隣した地域で発症した急性 E 型肝炎患者の急性期血清中から HEV 特異的 IgG 抗体をおよび 3 型 HEV 遺伝子が検出されたが、疫学的背景や遺伝子の相同性から、直接的な関連性は低いと推測された。愛知県では遺伝子が検出された 11 頭のイノシシのうち、2 頭は抗体陰性であり、感染初期であったものと思われる。ウイルスの検出はイノシシの年齢とは関連はなく、どの年齢のイノシシでもウイルスを持っている可能性がある。猟師と家族の 12.1% が HEV 抗体を保有していた。抗体を保有していたのはいずれも 60 歳代で、一般健康人の抗体保

有率と比較しても必ずしも高いとは言えない。また、抗体陽性者には肝炎の既往歴がなく、肝機能検査の結果も良好であり、狩猟した動物からの感染の可能性は低いと思われた。北海道・本州ともにシカの HEV 保有頻度は大変低いものと考えられた。1 次スクリーニングである ELISA 後の 2 次スクリーニングとして WB が有効であることが明らかとなった。

(2) 大きなサイズの組換え粒子

遺伝子型 3 の多いな VLP を作成することができた。患者血清を用いた抗体 ELISA で抗原性を見る限り差はなさそうである。三次構造の解析により、ネイティブな HEV 構造の情報が得られることも期待できる。

(3) NoV 汚染実態調査

処理場の前後で下水に含まれる NoV が 10^{-1} 以下とほとんど減少が見られない場合と、 10^{-3} 以上減少している場合があり、施設間で大きな差が認められた。この理由として、1 日当たりの下水処理量の違いと処理方法の違いが考えられた。下水処理場における塩素処理濃度は 0.1ppm 程度であり、この濃度では NoV は不活化されないと考えられる。また、流入水から NoV が検出されない夏季においても、余剰汚泥からはその上清でさえ毎月大量の NoV が検出された。このことから、下水処理場における NoV の減少は化学的に「処理」されているからではなく、「吸着および沈殿」によって物理的に減少することが主な原因なのではないかと考えられた。吸着・沈殿しているだけならば、その NoV は長期間感染性を保っていると考えられ、下水処理場での NoV の不活化について、実用的な方法を検討する必要があるだろう。流入下水や下水処理水から検出される NoV の遺伝子コピー数は年によって異なること、下水処理水から NoV 遺伝子が検出されたことから、従来のオキシデーションディッチ法では、NoV が十分に除去できないことが明らかになった。胃腸炎患者とシジミの関係では、NoV が系統樹上、同じクラスターに分類された例も多く、疫学的関連性が推察された。患者からは比較的大量の NoV が排泄され、下水や河川を經由してシジミを汚染し、蓄積されることが推察された。

現在老人ホーム等の集団発生で主流となっている Lordsdale 株が中国産のハマグリ

から検出され、現在わが国の集団発生患者から得られたものとの比較したところ、278bpのうち9塩基異なっており、日本で流行しているものと違う株と考えられた。今後多くの株との検討が必要であると考えられる。

(4) siRNAのHAV増殖抑制効果

もっとも抑制効果のあったsiRNAは他のHAV遺伝子型間でも塩基配列が高度に保存されている領域であるため遺伝子型がことなるHAVにも効果が期待できる。siRNAはA型肝炎の新規の治療薬になる可能性がある。

(5) SaV抗原検出ELISA

本研究で、SaVのGI, GII, GVがそれぞれ、互いに異なる抗原性を有することが明らかになった。SaVにおいても、同じゲノグループ内に存在するサブグループが、互いに異なる抗原性を有する可能性がある。今後、異なるサブグループのVLPと抗体を作製し、抗原性を比較検討する必要がある。

(6) リスクアセスメント

農薬や残留動物薬、添加物などの化学物質に対するリスクアセスメントとは異なり、ウイルスによる食品由来感染症のリスクアセスメントには、定まった公式がない。NoVの定量方法が十分でない現状では定量的手法を用いることは困難で、いかに目的に沿ったリスクアセスメント構成を考え、その構成に合わせたデータ収集と選別を行い、それらを定性的に評価するかが、重要であると思われる。

E. 結論

和歌山県の野生イノシシは3型HEV遺伝子を、愛知県の野生イノシシは4型遺伝子を持つ。シカ、カモシカはHEVに対する抗体は陰性で、これらからは遺伝子も検出されず、感染の事実はない。北海道・本州のシカ250検体からも抗体は全く検出されなかった。和歌山の散发性急性E型肝炎患者血清中からも3型HEV遺伝子と抗体が検出されたが、野生イノシシとの直接の因果関係は証明されなかった。感染実験から豚でのHEVの主要な感染部位は肝臓であり、肝臓で増殖したウイルスは胆のうで濃縮され、胆汁とともに消化管に移行して糞便中に排泄される。出荷時にHEVを保有する豚が存在する可能性はあり、豚食品においてHEVが含まれる危険性は、豚正肉よりも豚レバーならびに豚腸管のほうが高い。

組換えバキュロウイルスで遺伝子型3の構造蛋白全長を発現することによって、ネイティブな粒子とほぼ同じ直径を持つVLPを作製することができた。20nmのポアサイズをもつプラノバ20Nカラムでのこの粒子の除去率は99.9%以上であり、この実験条件で材料を処理することが可能であれば十分に実用化できる。

下水処理場におけるNoV除去率は処理施設により大きく異なっていた。処理能力の違いは1日当たりの下水処理量に関係しているのではないかと考えられた。また、下水処理場におけるNVの減少は、「吸着および沈殿」によって物理的に減少することが主な原因なのではないかと考えられた。NoVによる感染性胃腸炎患者からは比較的大量のNoVが排泄され、下水や河川を経由してシジミを汚染し、蓄積されることが推察され、患者とシジミ由来NoVには疫学的な関連性があることが示唆された。

市販カキの安全性を確保するためには、調べるカキの個数を特定しなければならないこと、食中毒事件では食材からのNV検出を行わなければならないこと、輸入魚介類のNV汚染は18%に認められ、充分加熱することが食中毒予防に大切であることが明らかになった。

HAVの構造蛋白を標的にしたsiRNAは増殖抑制効果が強く、A型肝炎の新規の治療薬になる可能性がある。SaV GII, GV VLPsの作出に成功し、サンドイッチ抗原ELISAシステムを構築した。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Tanaka E, Matsumoto A, Takeda N, Li T-C, Umemura T, Yoshizawa K, Miyakawa Y, Miyamura T, Kiyosawa K: Age-specific Antibody to Hepatitis E Virus Stays Constant during the Past 20 Years in Japan. J. Viral Hepatitis 2005: in press.

Maloney BJ, Takeda N, Suzaki Y, Ami Y, Li T-C, Miyamura T, Arntzen CJ, Mason HS: Challenges in creating a vaccine to

prevent hepatitis E. Vaccine 2005;23: 1870-1874.

Takamura S, Niikura M, Li TC, Takeda N, Kusagawa S, Takebe Y, Miyamura T, Yasutomi Y: DNA vaccine-encapsulated virus-like particles derived from an orally transmissible virus stimulate mucosal and systemic immune responses by oral administration. Gene Ther 2004;11: 628-35.

Matsubayashi K, Nagaoka Y, Sakata H, Sato S, Fukai K, Kato T, Takahashi K, Mishiro S, Imai M, Takeda N, Ikeda H: Transfusion-transmitted hepatitis E caused by apparently indigenous hepatitis E virus strain in Hokkaido, Japan.

Transfusion 2004;44: 934-40.

2. 学会発表

李 天成、恒光 裕、永田 典代、宮村 達男、武田 直和。3型HEV構造蛋白の発現と抗原性の解析。日本ウイルス学会、第52回学術集会 2004年110月 横浜

影山 努、小嶋 慈之、李 天成、片山 和彦、武田 直和。蛍光プローブを用いたHEVの高感度検出法および遺伝子型識別法の開発。同上。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金
食品の安全性・高度化推進研究事業

ウイルス性食中毒の予防に関する研究

平成 16 年度 分担研究報告書

春日 文子
田中 智之
榮 賢司
恒光 裕
有川 二郎
宮村 達男
西尾 治
米山 徹夫
片山 和彦
李 天成

平成 17 (2005) 年 4 月

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進研究事業）
ウイルス性食中毒の予防に関する研究

分担研究報告書

分担研究：定量的リスクアセスメントモデルの評価

分担研究者 春日文子 国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部第三室長

研究要旨： ウイルス性食中毒のリスクアセスメントの構成概要を提案するための準備として、米国FDAによって行われた微生物学的リスクアセスメントの事例について調査し、目的に応じたアセスメントの構成を検討するとともに、EC科学委員会によるノロウイルスに関するリスクアセスメント事例について、内容を調査した。

A. 研究目的

わが国においては、食品安全基本法の下に、食品の健康影響評価は内閣府食品安全委員会が行うものと定められた。厚生労働省は、法の定める場合には食品安全委員会に諮問を行なう必要がある。将来、ウイルス性食中毒に関し健康影響評価の諮問を行なう場合、厚生労働省として現在知られている知見を系統的に整理し、健康影響評価の目的と範囲を明確に規定することが必要である。それと同時に、想定される目的と範囲に応じ、健康影響評価の構成概要を提案することも、食品安全委員会の評価作業を支援することになるかと考えられる。

本研究では、ウイルス性食中毒に関するリスクアセスメントのために参照することを目的に、微生物学的リスクアセスメントの事例について調査し、目的に応じたアセスメントの構成を検討することとした。また、海外でのノロウイルスに関するリスクアセスメント事例について、内容を調査し

た。

B. 研究方法

米国FDAによって行われた2件の微生物学的リスクアセスメントについて、FDAのホームページからダウンロードできる報告書（草案）^{1~3)}ならびにモデルの内容をまとめた。

EC科学委員会によるノロウイルス（報告書発行当時はNorwalk-like Viruses）の公衆衛生対策に関する意見書の概要⁴⁾をまとめた。

C. 研究結果

C-1. FDA-CFSANによるカキの生食による腸炎ピブリオ感染のリスクアセスメント^{1) 3)}

目的

1) 病原性腸炎ピブリオによって汚染されたカキの生食によって起こる患者数を推定するための数学的モデルを作成す

ること

- 2) 生食用貝類の腸炎ビブリオに関する対策の公衆衛生上の効果を検討することにより、FDA をサポートするための情報を提供すること

そのための具体的な実施事項

- i) カキの生食により摂食される病原性腸炎ビブリオ菌数の推定
- ii) 病原性腸炎ビブリオ摂食菌数と疾病発症確率との関係の分析
- iii) 健康人と免疫不全者各グループにおける患者数と重篤度の推定
- iv) FDA の基準であるカキ1グラム当たり総ビブリオ数1万個以下の効果の評価

Hazard Identification

リスクアセスメントの背景として、腸炎ビブリオの発生状況や原因食品としてのカキの関与の情報が整理された。

Exposure Assessment

カキの収獲、処理、消費の3段階について、総ビブリオ数の変化が追跡された。収獲段階では、アメリカ沿岸が5地域（太平洋北部沿岸、大西洋北部沿岸、大西洋中部沿岸、ルイジアナ州メキシコ湾岸、ルイジアナ州以外のメキシコ湾岸）に分けられ、それぞれについて季節ごとの解析が行われた。最終的に、摂食された総ビブリオ数のうちの病原性の菌数が推定された。

Hazard Characterization

人体実験による用量-反応曲線を使用して Exposure Assessment の結果に基づいた発症数が算定された。

Risk Characterization

1) 各海域に由来するカキによる季節ごとの発症者数の推定、2) カキの冷凍や軽

度の加熱などの効果の比較、3) 感度分析による疾病発症に対して影響の大きい要因の特定、4) カキのグラム当たり総ビブリオ数の規制値を変動させた場合の、疾病防除率とカキの廃棄率の推定、が行われた。

結果

表1にまとめたような事項が推定、あるいは示唆された。

C-2. FDA-CVMによるフルオロキノロン耐性カンピロバクターのリスクアセスメント^{2) 3)}

目的

鶏へのフルオロキノロン投与に伴いフルオロキノロン耐性となったカンピロバクターに起因する人の健康被害実態を推計すること。そのために、図1に示すような構成をとっている。

セクション1

アメリカ CDC の FoodNet の対象地域において、検便検査からカンピロバクター症であると確定報告される年間患者数の平均値を推定。

セクション2

報告患者数から FoodNet 対象地域でのカンピロバクター症患者総数、さらに全米の患者総数を推定。

セクション3

鶏肉の消費によりフルオロキノロン耐性カンピロバクターに感染し、しかもフルオロキノロン耐性による治療上の問題が起こった患者数を推定。

セクション4

フルオロキノロン耐性カンピロバクターを保有する鶏肉の年間消費重量を推定。

セクション5

フルオロキノロン耐性カンピロバクターを保有する鶏肉の消費重量あたりの、フルオロキノロン耐性カンピロバクター患者発生係数を算出。

さらに感受性の異なる集団ごとの係数が推定された。また、それぞれのデータ項目（インプットパラメーター）がどのくらい最終的な集計結果（アウトプット）に影響しているかの分析（感度分析：sensitivity analysis）や、インプットパラメーターに備わる不確実性がどのくらいアウトプットの不確実性に影響しているかどうかの分析（不確実性分析：uncertainty analysis）も行われた。

特徴

鶏肉の辿るフードチェーンを農場から食卓まで網羅的に解析するのではなく、ヒトの疫学データを有効に活用している。膨大で複雑なモデルを構築することもなく、乏しいデータに多くの仮定を導入することもなかった。また、数学的に単純であるために、データが更新されたときにモデル全体を常に迅速にアップデートすることも容易になっている。

C-3. EC 公衆衛生に関連した獣医衛生行政に関する科学委員会 (The Scientific Committee on Veterinary Measures relating to Public Health) による Norwalk-like Viruses (以下 NLVs) についての意見書⁴⁾

目的

食品特に魚介類の NLVs 汚染によるリスクを推定し、健康被害の概要について消費者に情報を提供すること。

特に、

- (i) NLVs の検出と不活化に関する手法
- (ii) ヒトへのリスクを低減させる可能な対策

について、助言を与えること。

構成

・リスクアセスメント

Hazard Identification, Hazard Characterization, Exposure Assessment, Risk Characterization の各部分が、定性的手法で記述されている。

・分析法

臨床検体あるいは魚介類からの検出法、定量法、活性測定法、試験機関でのルーチンの手法としての PCR、NLVs に代わる指標微生物、分子疫学とそのウイルス追跡における利用について、記載されている。

・不活化法

NLVs の耐熱性、塩素耐性の知見から、食品加工過程で利用されうる種々の不活化法について、定性的なリスク評価を行っている。

・二枚貝と生鮮野菜における NLVs 汚染

・予防対策

二枚貝、野菜、他の食品、それら食品の取り扱いに関し、現行の関連規則の欧米比較も交えつつ、議論している。それら既存の規制や可能なウイルス除去手段の効果について、記述的な評価を行っている。

D. 考察

農薬や残留動物薬、添加物などの化学物質に対するリスクアセスメントとは異なり、ウイルスや細菌による食品由来感染症のリスクアセスメントには、定まった公式がない。そのため、リスクアセスメントの目的

に応じてどのようなアプローチを取るかは、個々に考えなければならない困難と柔軟性を備えている。将来実施されることが予想されるウイルス性食中毒のリスクアセスメントに備え、どのようなアプローチが応用可能であるかを考察するために、米国 FDA のそれぞれ異なるセクションによって実施された細菌感染に関するリスクアセスメントならびに EC によって行われたノロウイルス（当時は Norwalk-like virus）の意見書について、内容を調査した。

FDA・CFSAN によるカキの生食による腸炎ビブリオ感染のリスクアセスメントは、フードチェーンに沿って対象病原体の汚染と挙動を追跡するという、言わば典型的な微生物学的リスクアセスメントのタイプである。全米の FDA のラボがデータ収集に協力し、カキの収穫前から消費に至るプロセスについて、地域差と季節差を踏まえた解析を行っている。結果として見ているものも、カキの生食を原因とする腸炎ビブリオの患者数の推定値から、感度分析による患者数増加に対して影響の大きい要因の特定、規制値変更後に予測される患者発生数とカキの棄却率、と幅広い。その一方で、広範かつ網羅的な微生物データがない場合、このアプローチは適用が難しいと思われる。

それに対し、同じ FDA であるが CVM によって行われたフルオロキノロン耐性カンピロバクターのリスクアセスメントでは、ヒトの疫学データを有効に活用し、フードチェーンに沿ったデータをほとんど必要としていない。しかし報告に上る患者数だけでなく、健康被害の実数を把握する疫学情報収集システムの充実している米国だからこそ可能となった手法とも言えるものであ

る。

EC 科学委員会による意見書は、定性的なリスクアセスメントである。NLVs の定量方法が十分でない現状では定量的手法を用いることは困難である。いかに目的に沿ったリスクアセスメント構成を考え、その構成に合わせたデータ収集と選別を行い、それらを定性的に評価するかが、重要であると思われる。わが国においても、基本的には定性的アプローチを取らざるを得ないと考えられる。そのための基礎データの収集と検出方法の開発は、本研究班の他の分担研究者によって進められている。また、平成 15 年度厚生労働科学研究費補助金「食品中の微生物のリスク評価に関する研究」⁵⁾において、茅ヶ崎市内の医療機関におけるノロウイルス感染症の疫学調査が実施されている。ノロウイルス感染に占める直接食品由来感染症の割合や推定原因食品についての知見として有用であると考えられる。

E. 参考文献

- 1) <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/vprisk.html>
- 2) http://www.fda.gov/cvm/antimicrobial/Risk_asses.htm
- 3) 春日文子：定量的リスクアセスメント、「食品のリスクアナリシス」（山本、山崎共編）、オーム社、2004
- 4) European Commission: Opinion of the Scientific Committee on Veterinary Measures relating to Public Health on Norwalk-like Viruses, adopted on 30-31 January 2002
- 5) 山本茂貴、春日文子、鈴木周雄、新関

寛二、木下正俊：感染性胃腸炎患者におけるノロウイルス患者の実態調査、厚生労働科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）「食品中の微生物のリスク評価に関する研究」分担研究報告書

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

① Michiru Kishimoto, Yuichi Hioki, Tetsuya Okano, Hirotaka Konuma, Kazuhiro Takamizawa, Hajime Kashio, Fumiko Kasuga

Ribotyping and a Study of Transmission of *Staphylococcus aureus* Collected from Food Preparation Facilities

Journal of Food Protection 2004; 67(6): 1116-1122

② Fumiko Kasuga, Masamitsu Hirota, Masamichi Wada, Toshihiko Yunokawa, Hajime Toyofuku, Masayoshi Shibatsuji, Hideshi Michino, Toshiaki Kuwasaki, Shigeki Yamamoto, Susumu Kumagai

Archiving of Food Samples from Restaurants and Caterers

– Quantitative Profiling of Outbreaks of Foodborne Salmonellosis in Japan

Journal of Food Protection, 2004, 67 (9): 2024-2032

③ T. Matsui, S. Suzuki, H. Takahashi, T. Ohyama, J. Kobayashi, H. Izumiya, H. Watanabe, F. Kasuga, H. Kijima, K.

Shibata, and N. Okabe

Salmonella Enteritidis outbreak associated with a school-lunch dessert: cross-contamination and a long incubation period, Japan, 2001

Epidemiology and Infection, 2004, 132, 873-879

④ Kazuo Abe, Noriyuki Saito, Fumiko Kasuga, Shigeki Yamamoto

Prolonged incubation period of salmonellosis associated with low bacterial doses

Journal of Food Protection, 2004; 67(12): 2735-2740

⑤ 岸本 満、鈴木匡弘、森田妃美子、丹羽珠梨、樫尾 一、日置祐一、岡野哲也、小沼博隆、高見澤一裕、春日文子

調理施設から採取された黄色ブドウ球菌の RAPD-PCR, BSFGE および PFGE による遺伝子多型解析

食品微生物学雑誌 21 巻 3 号、193-200、2004

2. 学会発表

① Kunihiro Kubota, Fumiko Kasuga, Kaoru Morikawa

Probabilistic analysis of cross contamination during cooking

International Association for Food Protection 91th Annual Meeting, Phoenix, Arizona, August 8-11, 2004

② 朝倉宏、五十君静信、柳忠湖、鈴木荘介、春日文子、山本茂貴、熊谷進

Providencia alcalifaciens における LPS の
病原性への関与
第 138 回日本獣医学会、札幌市、2004 年 9
月 10～12 日

③Fumiko Kasuga, Morris Potter, Jeffery
Farber

Surveillance and trends in food borne
diseases; international perspective
The First ICMSF-China Food Safety
International Conference
Beijing, 21-22 Oct 2004

④春日文字

食品微生物規格基準の科学的背景
第 88 回日本食品衛生学会シンポジウム、広
島市、2004 年 11 月 11 日

⑤春日文字

食品微生物規格基準設定の国際動向と食品
製造への応用
日本食品微生物学会第 23 回学術セミナー、
大津市、2005 年 2 月 25 日

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

表 1. FDA によるカキの生食に伴う腸炎ビブリオ食中毒のリスクアセスメントの結果
(<http://www.cfsan.fda.gov/~dms/vprisk.html>より概訳)

1. カキの生食により、米国国内では年間平均 4,750 人の患者発生があるものと推定される。この患者数は、1,000 人から 16,000 人の間で変動するであろう。
2. 何らかの基礎疾患をもつ患者は、腸炎ビブリオの感染により敗血症を併発し重篤化する危険性が高い。
3. 疾病発症数に対して最も大きい影響をもつ要因は、収穫時のカキにおける総ビブリオ数である。
4. 収穫時のカキにおける初期菌数に最も大きい影響を与える要因は、収穫時の気温と海水温である。
5. 収穫時のカキの総ビブリオ数が現在の規制値である 1 グラム当たり 1 万個以下ということで遵守されると、患者発生数は現在の 85%になる。
6. 収穫直後にカキを冷凍あるいは冷蔵すること、あるいはカキを 50℃ 5 分間程度で加熱することは、有意に患者数を減らす効果がある。

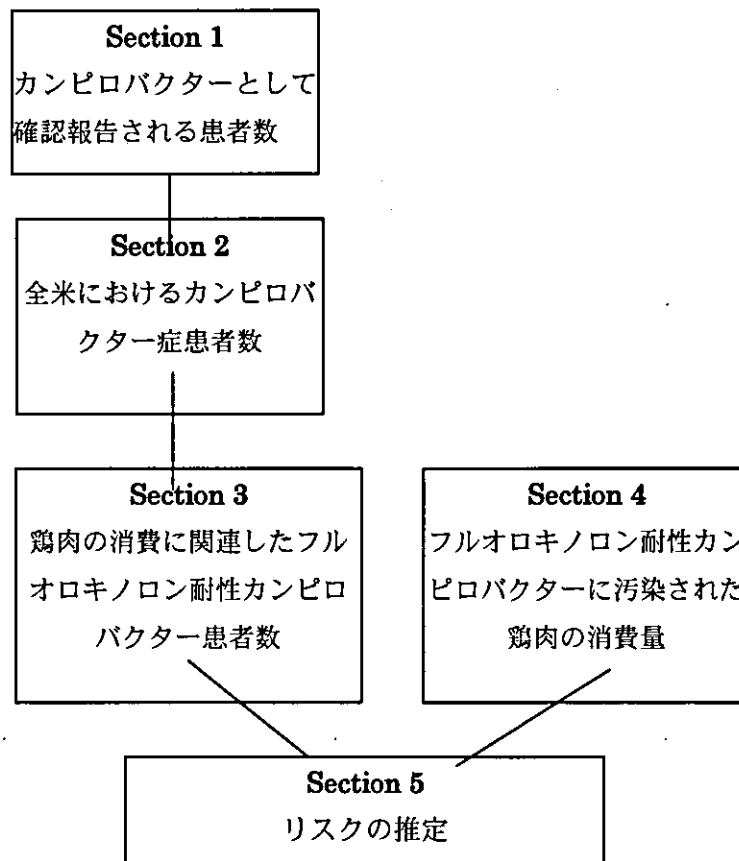


図1. FDAによる鶏肉の消費に伴うフルオロキノロン耐性カンピロバクターのリスクアセスメントの概要 (http://www.fda.gov/cvm/antimicrobial/Risk_asses.htmより)