

(倫理面からの配慮について) 用いた患者血清は国立感染症研究所の李天成先生から分与されたものである。当該研究所ですでに研究目的で使用が認められているものであり、さらに無記名で分与されたものであることから、倫理面からの問題はない。各種免疫血清の採血はいずれも深麻酔後全採血、安楽死処分を行ったものであり、動物福祉の観点からも問題は無いと判断された。

C. 研究成果

精製ウイルス粒子様抗原をエゾシカに免疫して作成した標準陽性血清は同抗原を用いたELISAおよびWBで強く反応した。特に、WBのパターンはヒト患者血清で得られるパターンと同一で、しかも予想される分子量を示したことから、精製ウイルス粒子様抗原を用いるELISAとWBは、HEV特異的抗体を検出していると考えられた。

本州の日本シカを2地点150検体、北海道のエゾシカを5地点100検体調べたところ、明らかな陽性例は認められなかった。抗シカ2次抗体(KPL社)を500倍希釈で用いた時に強く反応する血清が見つかったが、それらはすべてWBでは陰性であった。この血清では、2次抗体の希釈倍率を高くするとELISA吸光度が急速に低下したことから、非特異反応によるものと考えられ、抗HEV抗体陰性と判断された。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。

D. 考察

現在までの結果では、北海道・本州ともにシカにおけるHEV保有頻度は低いものと考えられる。また、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。現在、野生イノシシ・家畜ブタ・牛においても、標準陽性血清を準備し、同様の血清疫学調査を進めている。

E. 結論

本研究によって北海道・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。しかしながら本研究では採集ポイント数および検体数が十分とはいえないため、今後もシカの検体数を増やし、さらに確実な保有状況調査を進めて行く必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Okumura, M., Yoshimatsu, K., Araki, K., Lee, B. H., Asano, A., Agui, T. and Arikawa, J.: "Epitope analysis of monoclonal antibody E5/G6, which binds to a linear epitope in the nucleocapsid protein of hantaviruses." *Archives of Virology*, 149:2427-2434 (2004)

2. 学会発表

1) 奥村恵、吉松組子、LEE Byoung-Hee、荒木幸一、中村一郎、有川二郎：シュードタイプウイ

ルスによるハンタウイルスの細胞トロピズムの
解析、第52回日本ウイルス学会 横浜 (2004. 1)

Ⅱ 知的財産権の出願・登録状況
特になし

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

分担研究報告書

E 型肝炎ウイルスの除去に関する研究

分担研究者 宮村達男 国立感染症研究所ウイルス第二部

研究要旨 E 型肝炎ウイルス (HEV) がプラノバ 35N カラムおよびプラノバ 20N カラムによって除去できるか否かを検討した。プラノバ 35N カラムでは、溶出液原液における相対値は 0.05-0.09 であり、91-95%の除去率であった。一方、プラノバ 20N カラムでは原液の OD 値は低く、相対値として算出できなかった。したがって、除去効率は、99.9%以上と思われた。材料に含まれる HEV 濃度を明確にし、実用化が可能か否かを検討する必要がある。

研究協力者 李 天成 (国立感染症研究所ウイルス第二部、岡田義昭 (国立感染症研究所血液安全性研究部)

A. 研究目的 E 型肝炎は E 型肝炎ウイルス (HEV) 感染によって引き起こされる急性肝炎である。稀に劇症化し、死に至る場合もある。従来わが国には存在しない疾患であると考えられ、事実、わが国における発生は E 型肝炎の常在国に旅行や仕事で滞在後帰国して発症する、いわゆる輸入感染例が大部分であった。しかし、近年、全く海外渡航歴のない人での発症がみられたり、昔の血清をよく調べてみると HEV 遺伝子が検出されるなど、わが国にも土着の HEV が存在することが明らかになってきた。さらに、ブタ、イノシシ、ドブネズミ等から類似の遺伝子が検出されるなど、人畜共通感染症として注目されている疾患である。また、輸血を介した感染が国内で既に 3 例確認されるなど、多様な伝播経路が明らかになっている。本研究では、E 型肝炎ウイルス (HEV) がプラノバ 35N カラムおよびプラノバ 20N カラムによって除去できるか否かを検討した。

B. 研究方法 E 型肝炎ウイルス抗原の調製：3 型遺伝子をもつ HEV の構造蛋白領域を組換えバキョロウイルスで発現し、感染細胞からネイティブな粒子と同じサイズを持つ組換え粒子をショ糖密度勾配遠心、塩化セシウム平衡密度勾配遠心で精製した。

抗原 ELISA：組換え粒子に対する高力価ウサギ血清を用いてマイクロプレートで固相化した。サンプル 100 μ l をマイクロプレートの第 1 管に添加し、第 2 管以後 4096 倍まで 2 倍階段希釈し、OD 値を求めた。二次抗体には組換え粒子に対する高力価モルモット血清を、検出抗体は HRP 標識抗モルモット IgG を用いた。

C. 研究結果 5% ヒト IgG 溶液に 100 μ g の組換え粒子を懸濁して 3ml 溶液とした。これのうちの 2.5ml をプラノバ 35N カラムに充填し、溶出液を回収した。残りの 0.5ml は処理前サンプルとして保管した。2 本のプラノバ 35N カラムで同じ実験を繰り返し、再現性を見た。一方、イーグル MEM に 100 μ g の組換え粒子を懸濁して 3ml 溶液とし、

これのうちの2.5mlをプラノバ20Nカラムに充填した。0.5mlは処理前サンプルとした。プラノバ35Nカラムと同様に、溶出液を回収した。

処理前サンプルについて未希釈、10倍希釈、100倍希釈液を調製し、それぞれの2倍階段希釈におけるOD値を求め、サンプルに含まれる組換え粒子数を相対値として計算した。10倍希釈と100倍希釈の相対値はほぼ10で、この方法で除去率を算出できるように思われた。プラノバ35Nカラムでは、溶出液原液における相対値は0.05-0.09であり、91-95%の除去率であった。一方、プラノバ20Nでカラムは原液のOD値は低く、相対値として算出できなかった。したがって、除去効率は、99.9%以上と思われた。

D. 考察

今回試験に用いたHEVの中空粒子は電子顕微鏡による観察から直径が35-38nmである。したがって、35nmのポアサイズをもつプラノバ35Nカラムでの91-95%の除去率は予想された結果であった。用いた実験条件での再現性も問題なかったが、この程度の除去率ではとても実用化できるものではない。一方、20nmのポアサイズをもつプラノバ20Nカラムでの除去率は99.9%以上であり、この実験条件で実際の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であろう。5%ヒトIgG溶液をプラノバ20Nに充填した場合の処理速度が問題と思われる。

E. 結果

20nmのポアサイズをもつプラノバ20Nカラムでの除去率は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。

F. 研究発表

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;in press.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許申請：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）
分担研究報告書

ウイルス性食中毒の予防に関する研究
分担研究項目：食品のウイルス汚染状況に関する研究

分担研究者	西尾 治	国立感染症研究所感染症情報センター
研究協力者	杉枝正明、倉重英明	静岡県環境衛生科学研究所微生物部
	古屋由美子、片山 丘	神奈川県衛生研究所微生物部
	山下育孝	愛媛県立衛生環境研究所衛生研究課
	西田知子	山口県環境保健研究センター生物部
	野田 衛	広島市衛生研究所生物科学部
	福田 伸治	広島県保健環境センター微生物第2部
	植木 洋、山木紀彦	宮城県保健環境センター微生物部
	吉澄志磨	北海道立衛生研究所感染症センター微生物部
	田中俊光	千葉市環境保健研究所医科学課
	徳竹由美	長野県環境保全研究所感染症部
	秋山美穂、愛木智香子	国立感染症研究所感染症情報センター

研究要旨

わが国の生食用カキ、輸入食品のウイルス汚染状況を把握し、安全性の評価を行うため、RT-PCR法とリアルタイムPCR法でノロウイルス(NV)とA型肝炎ウイルス(HAV)の検出を実施した。わが国の生食用カキでは12月からノロウイルスが検出され、1月は24%と高い汚染率であった。市販カキNV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NV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。

A. 研究目的

わが国の生食用カキおよびアジアからの輸入生鮮魚介類のウイルス汚染状況を調査し、食品の安全性を確保するための基礎データの蓄積を目的とした。

さらに、カキを介する食中毒および有症苦情の食材についてNVの汚染量を調査し、発病との関連性を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1. 調査対象

生食用カキは2004年9月～2005年1月の間に市販されている104パックを買い上げて行った。さらに、22件は海域から直接採取した。輸入生鮮魚介類は愛知県と千葉市に輸入された生鮮魚介類85検体を検査対象とした。

食中毒事件および有症苦情の原因とされる10事件からのカキ51個について検査を行った。

2. 検査方法

貝類からのウイルスの濃縮、RNA抽出：

貝類は3個の中腸腺を取り出しホモジナイズした後、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 Biosciences)を用いてSuper Script II RT(Invitrogen)で逆転写し、cDNAを合成した。

NVの検出：

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/ALPF/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は、カプシ

ド領域のプライマーを用いて行った。

HAVの検出：

リアルタイムPCR法およびRT-PCR法でHAVの検出を行った。リアルタイムPCR法のプライマーは、HAV+449プライマーとHAV-557プライマーを用い、プローブはTaq Man プローブ(ABI)で、HAV+482-P-FAMを用いた。RT-PCRは、HAV+2799/-3273、およびHAV+2907/-3162プライマーを用いて実施した。

シーケンス：

RT-PCR法で増幅されたPCR産物は、ダイレクトシーケンス(ABI PRISM 310NT Genetic Analyzer)で塩基配列を決定した。塩基配列が決定できたものは、標準株を用いて系統樹解析を行った。

C. 研究結果

1. 生食用カキにおけるNV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NVおよびHAV共に検出されなかった。

12月からNV陽性が認められ、1月はNVが24%と高率に認められた(表1)。

表1 生食用カキ月別NV汚染状況

月	検査数	陽性数	陽性率	定量値(カキ中腸線1個当たりのコピー数)							遺伝子型
				0	>0 ~ <60	≥60 ~ <125	≥125 ~ <300	≥300 ~ <500	≥500 ~ <1000	≥1000	
9	1	0	0%	1	0	0	0	0	0	0	
10	8	0	0%	6	1	1	0	0	0	0	
11	28	0	0%	21	6	1	0	0	0	0	C1, C30
12	38	3	7.9%	29	5	1	0	0	0	3	C1, C14, C20
1	46	11	23.9%	14	18	3	2	1	6	2	C1, C30, C33
合計	126	14	11.1%	73	33	6	2	1	6	5	

表2 パック詰めカキ各3個のNV汚染状況

同一ロットのカキの NV 定量値	延パツク数 (%)	延パツク数	定量値 (カキ中腸線 1 個当たりのコピー数)				
			0	≥0 ~ <125	≥125 ~ <500	≥500 ~ <1000	≥1000
3 個とも同じレベル	60 (58%)	60	***				
1 個が異なるレベル	41 (39%)	26	**	*			
		2	**		*		
		4	**			*	
		2	**				*
		4	*	**			
		1	*	*		*	
		1	*			**	
		1		*		**	
3 個とも異なるレベル	3 (3%)	1	*	*			*
		1	*		*	*	
		1			*	*	*
合計		104					

表2にはパック詰め104パックにおける各3個のNV汚染状況を示した。3個全てにおいてNV陰性は60パック(65%)に認められ、しかし、3個とも ≥ 125 コピー/個の値を示したものは1パックに見られなかった他は、 < 125 コピー/個と ≥ 125 コピー/個が混在していた。3個のうち2個が同じレベルのものは41パックに、3個が全て異なるレベルは3パックに見られた。

なお、HAVは全て陰性であった。

カキから検出された遺伝子型はG1ではC-1、C-33でDSV、C-30はNV類似とC-33が、G2ではHawaii類似のC-14、Miami類似のC-20が検出された。

2. 輸入魚介類におけるNVおよびHAV汚染状況

輸入魚介類からの月別NVおよびHAV汚染状況を表3に示した。

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NV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。

貝種別ではアカガイが18%、ハマグリが19%からNVが検出された(表4)。

国別では韓国産が14%のNV汚染率で、アカガイからであった。中国産は20%のNV汚染率で、アカガイおよびハマグリ共にほぼ20%の汚染が認められた(表5)。ロシア産の2件は陰性であった。

表3 輸入魚介類月別 NV および HAV 汚染状況

月	検体数	NV		HAV	
		陽性数	陽性率	陽性数	陽性率
4	2	0	0%	0	0%
5	0	0	0%	0	0%
6	8	0	0%	0	0%
7	15	0	0%	0	0%
8	9	0	0%	0	0%
9	12	0	0%	0	0%
10	8	2	25.0%	0	0%
11	12	4	33.3%	0	0%
12	4	1	25.0%	0	0%
1	10	6	60.0%	0	0%
2	5	2	40.0%	0	0%
3	0	0	0%	0	0%
合計	85	15	17.6%	0	0%

表4 輸入魚介類種類別 NV および HAV 汚染状況

種類	検体数	NV		HAV	
		陽性数	陽性率	陽性数	陽性率
アカガイ	57	10	17.5%	0	0%
ハマグリ	26	5	19.2%	0	0%
アゲマキガイ	2	0	0%	0	0%
合計	85	15	17.6%	0	0%

表5 輸入魚介類国別 NV 汚染状況

国	検体数	陽性数	陽性率	種類	検体数	陽性数	陽性率
韓国	29	4	13.8%	アカガイ	27	4	14.8%
				アゲマキガイ	2	0	0%
中国	54	11	20.4%	アカガイ	28	6	21.4%
				ハマグリ	26	5	19.2%
ロシア	2	0	0%	アカガイ	2	0	0%
合計	85	15	17.6%				

また、HAV は全ての検体で陰性であった。

検出された NV 遺伝子の系統樹を示した。G1 では中国産から Stav と C-36 (AY641760) 類似株が、韓国産から

C-33 (AY641759) 類似株が検出された (図 1)。G2 では C-20 (AY641749)、Miami、C-18 (AY641765)、SMV/76、C-14 (AY641763)、Chitta、C-9 (AY641748) 類似の 7 遺伝子型が検出された (図 2)。

[GENETYX-MAC:Ver, 11.1]
Method: UPGMA

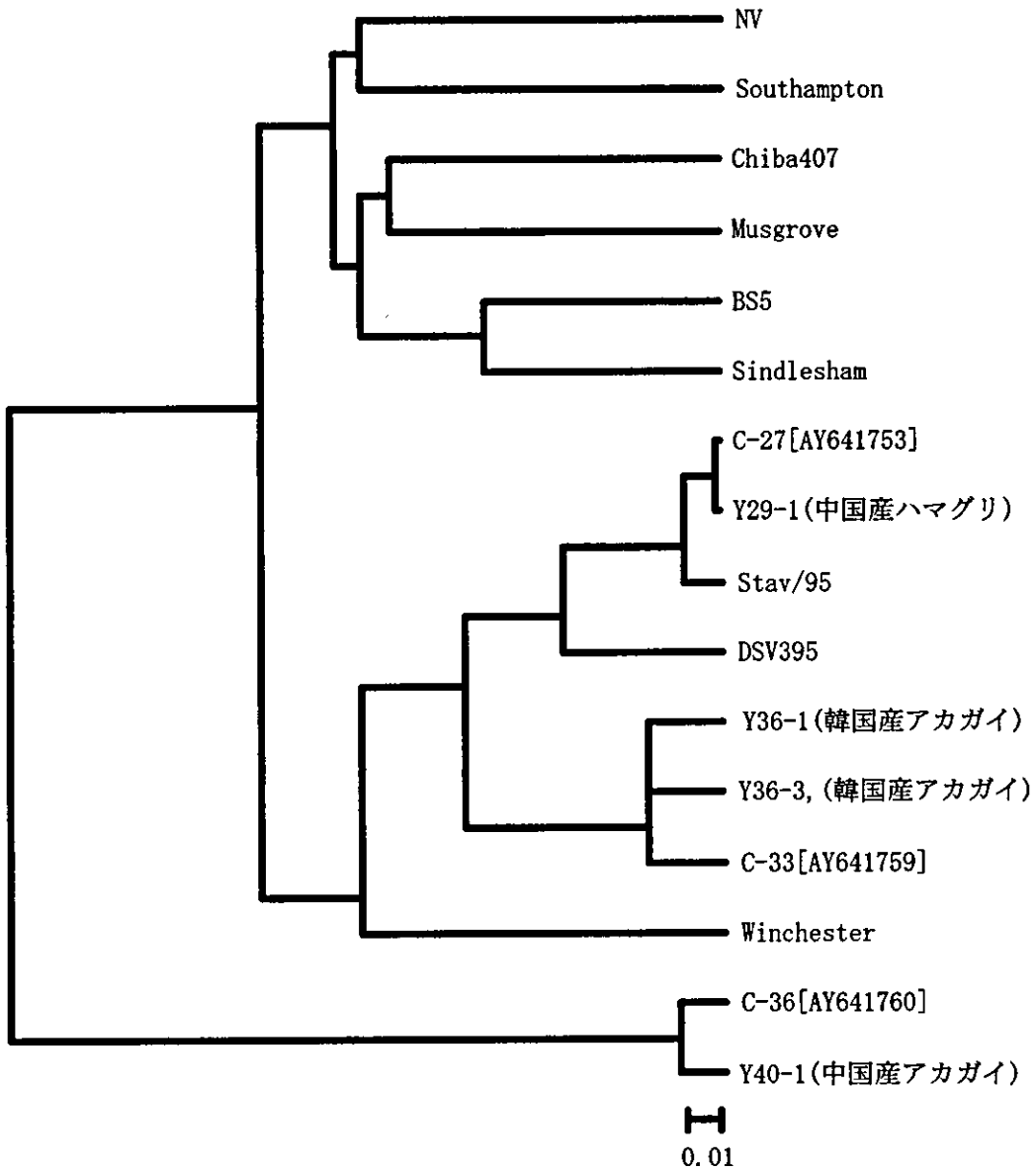


図 1 輸入魚介類から検出された NV G1 系統樹

[GENETYX-MAC: Ver, 11. 1]

Method: UPGMA

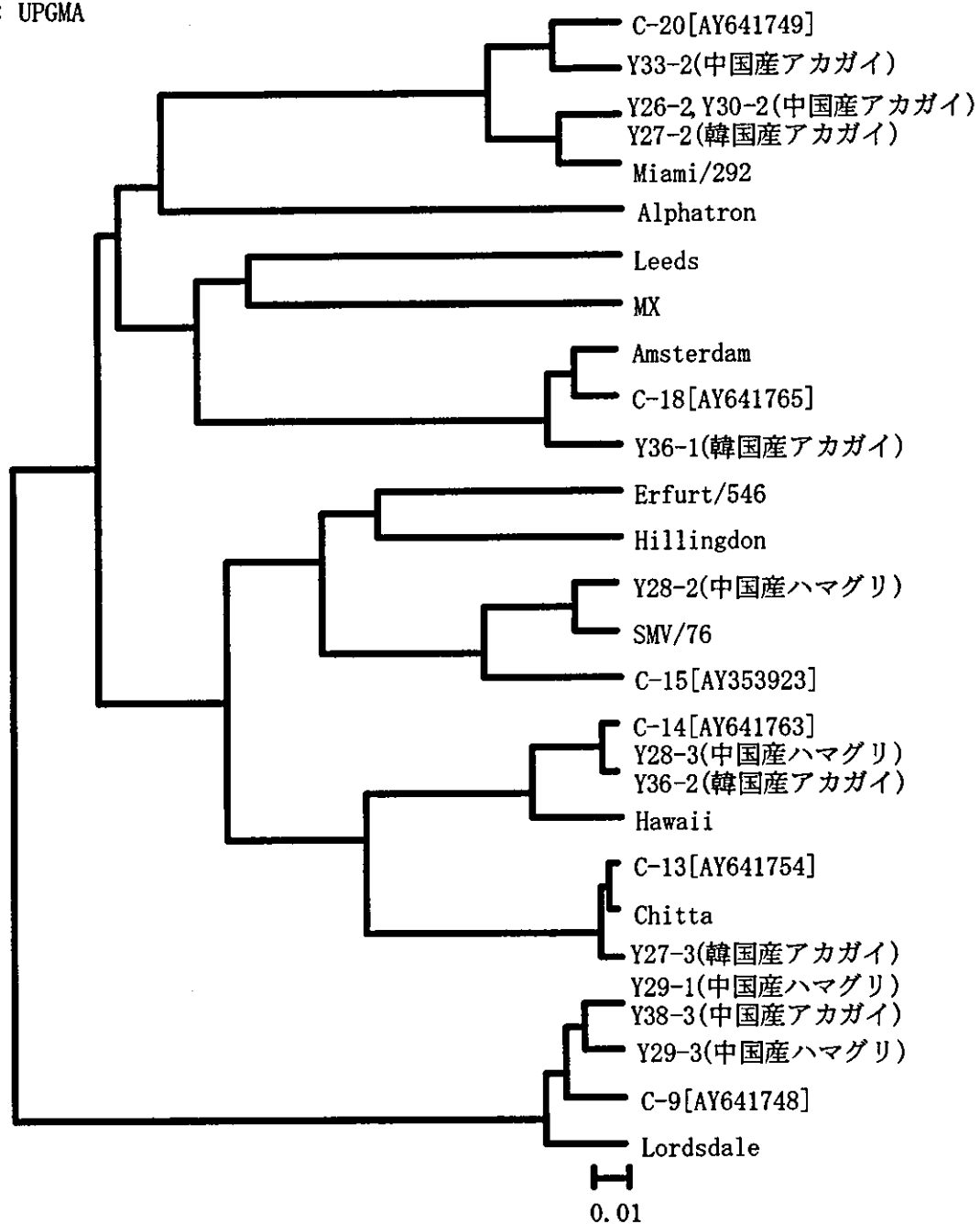


図2 輸入魚介類から検出された NV G2 系統樹

表6 事件カキ NV 汚染状況

事例 NO.	採取日	検査数	定量値（カキ中腸線 1 個当たりのコピー数）				
			0	≥0 ～ <125	≥125 ～ <500	≥500 ～ <1000	≥1000
事件 1	2004. 12. 08	1	1				
事件 2	2004. 12. 08	6	6				
事件 3	2004. 12. 14	2		2			
事件 4	2004. 12. 14	4	2	2			
事件 5	2004. 12. 16	4	4				
事件 6	2004. 12. 16	5	5				
事件 7	2004. 12. 16	6	4	1	1		
事件 8	2004. 12. 22	11	10	1			
事件 9	2004. 12. 27	9	9				
事件 10	2005. 01. 05	3	3				
合計		51	44	6	1	0	0

3. 事件カキの NV 汚染状況

カキによる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 NV 汚染量を調べた。事件ではっきりと NV 陽性であったのは、10 事件のうち 1 事件(事件 No. 7)で、6 個検査したうち 1 個について NV 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(表 6)。

5 事件は検査したカキの全てが 0 コピーであった。

D. 考察およびまとめ

わが国の生食用カキは 12 月から NV 陽性が認められ、1 月に NV 汚染率が高率であった。このことは例年見られる傾向であり、カキの NV 汚染は乳幼児を中心とした NV による胃腸炎の流行に遅れてカキが陽性となる。カキから検出された NV

のシーケンスから、現在全国的に流行している Lordsdale 型が検出されていないので、今後更なる検討が必要と考えている。

また、パック詰めのカキ 3 個について、個々に検査したところ、その汚染度は様々であった。このことから、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と考えている。

今回の食中毒もしくは有症苦情カキの検査では、NV 陽性とされたのは 1 事件のみであり、それも 6 個のうちの 1 個に過ぎなかった。また、10 事件中 6 事件は検査したカキは NV 陰性であった。今回起きた事件は 12 月から 1 月の始めであり、この時期は市販カキの NV 汚染は非常に低率であった。このことから、カキ事例としているが、カキが原因食材でなかった可能性がある。今後、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といえる。

輸入魚介類の NV 汚染は 18% に認められ、例年とほぼ同様の汚染率であった。アカガイ、ハマグリは殆どが輸入であり、この汚染度はわが国に流通しているこれら魚介類の NV 汚染度と考えられる。毎年、カキ以外の二枚貝によって食中毒事件が数件起きており、これら食品は充分加熱することが食中毒予防に大切である。

また、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た。そこで、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が、今後多くの株との検討が必要であると考えられる。

E. 研究発表

1. 論文発表

Li L, Shimizu H, Doan LTP, Tung PG, Okitsu S, Nishio O, Suzuki E, Seo JK, Sim JG, Muller WEG, Ushijima H : Characterizations of Adenovirus Type 41 isolates from children with acute gastroenteritis in Japan, Vietnam and Korea. *J Clin Microbiol.* 42:4032-4039, 2004

Tsuguto Fujimoto, Teruo Okafuji, Masahiro Ito, Soichi Nukuzuma, Masatsugu Chikahira, and Osamu Nishio : Evaluation of a bedside immunochromatographic test for detection of Adenovirus in respiratory samples, by comparison to virus isolation, PCR, and Real-Time PCR. *J*

Clin Microbiol. 42:5489-5492, 2004

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、32:189-194, 2004

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、32:195-201, 2004

西尾治、秋山美穂、愛木智香子 : ノロウイルスによる食中毒、月刊 HACCP、109 : 48-50, 2004

西尾治、吉澄志磨、野田衛 : ウイルス性食中毒について 一特にノロウイルスおよび A 型肝炎ウイルス一、日本食品微生物学会雑誌、21:179-186, 2004

吉澄志磨、三好正浩、石田勢津子、奥井登代 : ノロウイルスによる胃腸炎集団発生について一北海道、2003/04 シーズン一、北海道立衛生研究所報、54:37-42, 2004

原みゆき、古屋由美子、片山丘、高橋孝則、今井光信 : ウイルス性食中毒の発生状況 (平成 15 年度)、神奈川県衛生研究所研究報告、34:6-8, 2004

福田伸治、高尾信一、桑山勝、島津幸枝、宮崎佳都夫 : 小児感染性胃腸炎におけるアストロウイルスの検出状況と血清型、広島県保健環境センター研究報告、12:29-32, 2004

福田伸治、桑山勝、高尾信一、島津幸枝、宮崎佳都夫：最確数法を応用したカキのノロウイルス遺伝子の定量、広島県保健環境センター研究報告、12:33-36、2004

S. Oie, C. Yanagi, H. Matsui, T. Nishida, M. Tomita, A. Kamiya : Contamination of Environmental Surfaces by Staphylococcus aureus in a Dermatological Ward and Its Prevention Measures. Biol Pharm Bull. 28(1), 2005

Tibor Farkas, Setsuko Nakajima, Masaaki, Xiaoyun Deng, Weiming Zhong, and Xi Jiang : Seroprevalence of Noroviruses in Swine. JCM. 43(2):657-661, 2005

2. 学会発表

平瀧洋一、有澤孝吉、西尾治、中込治：長崎市のレストランで発生したノロウイルスGⅡメキシコ株の集団食中毒、第78回日本感染症学会、東京、2004年4月6-7日

荒川香南子、中野陽子、山内昭則、杉山明、中山治、西尾治：カキ及び養殖海域のノロウイルス汚染調査、衛生微生物協議会第25回研究会、埼玉、2004年7月8-9日

西田知子、岡本玲子、中尾利器、松村健道、大瀬戸光明、西尾治：山口県内におけるノロウイルス胃腸炎発生事例および市販生食用カキの汚染状況、平成16年度全国公衆衛生獣医師協議会、東京、2004年9月3日

西田知子、岡本玲子、戸田昌一、中尾利器、松村健道：ノロウイルスによる胃腸炎集団発生と市販生食用カキの汚染状況、中国地区食品衛生監視員研究発表会、福山、2004年9月10日

愛木智香子、西尾治、大瀬戸光明、杉枝正明、古屋由美子：輸入生鮮魚介類のウイルス汚染実態調査成績について、第53回日本感染症学会東日本地方会、新潟、2004年10月21-22日

岩間真人、神田隆、西尾治：ノロウイルスによる食中毒等の防止に関する調査、第63回日本公衆衛生学会、松江、2004年10月27-29日

西田知子、岡本玲子、戸田昌一、中尾利器、松村健道、大瀬戸光明、西尾治：ノロウイルスによる胃腸炎集団発生と市販生食用カキの汚染状況、平成16年度全国食品衛生監視員研究発表会、東京、2004年10月28-29日

西田知子、野田衛、大瀬戸光明、三上稔之、篠原美千代、入谷展弘、植木洋、川本歩、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、日本食品衛生学会第88回学術講演会、広島、2004年11月11-12日

秋山美穂、愛木智香子、西尾治、福田伸治、西田知子：平成15年度に発生したノロウイルスによる食中毒事例について、日本食品衛生学会第88回学術講演会、広島、2004年11月11-12日

西尾治：ノロウイルスによる食中毒、第36回日本小児感染症学会、東京、2004年11月12-13日

乾あやの、十河剛、藤澤知雄、西尾治：
ノロウイルスによる急性胃腸炎の臨床的
特徴、第36回日本小児感染症学会、東京、
2004年11月12-13日

古屋由美子、原みゆき、片山丘、杉枝正
明、大瀬戸光明、藤本嗣人、宇宿秀三、
田中俊光、西尾治：輸入生鮮魚介類のウイ
ルス汚染状況について、第52回日本ウイ
ルス学会、横浜、2004年11月21-23日

田村務、西川眞、西尾治、鈴木宏：急激に
感染拡大したノロウイルス、Lordsdale
近縁種による急性胃腸炎の分子疫学的解
析、第52回日本ウイルス学会、横浜、2004
年11月21-23日

山下育孝、大瀬戸光明、近藤玲子、豊嶋
千俊、西尾治：急性胃腸炎の散发例及び集
団発生例から検出されたノロウイルス
(NV)の分子疫学、第52回日本ウイルス
学会、横浜、2004年11月21-23日

西田知子、野田衛、三上稔之、篠原美千
代、大瀬戸光明、入谷展弘、植木洋、吉
澄志磨、岩田祐之、西尾治：3シーズンに
おける国内産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52

回日本ウイルス学会、横浜、2004年11
月21-23日

Phan Gia Tung、大亀路生、Tuan Anh Nguyen、
沖津祥子、西尾治、牛島廣治：Genetic
Diversity of Sapovirus in Fecal
Specimens from Infants and Children
with Acute Gastroenteritis in Pakistan、
第52回日本ウイルス学会、横浜、2004
年11月21-23日

福田伸治、高尾信一、桑山勝、島津幸枝、
宮崎佳都夫：LAMP法による糞便からのノ
ロウイルスの検出、第52回日本ウイルス
学会、横浜、2004年11月21-23日

原みゆき、古屋由美子、片山丘、高橋孝
則、今井光信：神奈川県で発生したウ
イルス性食中毒について(平成15年度)、
第50回神奈川県公衆学会、横浜市、2004
年

西田知子、岡本玲子、中尾利器、松村建
道、加藤大智、岩田祐之、西尾治：山口県
内におけるノロウイルス胃腸炎集団発生
事例および市販食用カキの汚染状況、
平成16年度日本獣医公衆衛生学会、新潟、
2005年2月10-12日

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）
分担研究報告書

ウイルス性食中毒の予防に関する研究
分担研究項目：下水処理場におけるノロウイルスの消長

分担研究者 西尾 治 国立感染症研究所感染症情報センター
研究協力者 植木 洋、山木 紀彦 宮城県保健環境センター微生物部

研究要旨

ノロウイルス（NV）の養殖カキへの汚染経路はヒト～下水処理場～河川～海～カキと考えられているため、下水処理場の流入下水、処理水中から検出される NV 遺伝子を量的に調査した。

下水処理場での流入下水中から 15 回の調査のうち 11 回（73.3%）から NV 遺伝子が検出された。さらに、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を 2003 年と 2004 年で月ごとに比較すると同時季であっても異なる傾向であり、NV 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 NV 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（Oxidation Ditch：OD 法）では、十分に除去できない NV の存在が明らかになった。

A. 研究目的

NV の養殖カキへの汚染経路はヒト～下水処理場～河川～海～カキと考えられている。そこで、下水処理法として一般的に用いられている OD 法で処理が行われている下水処理場の流入下水、処理水中から検出される NV 遺伝子を量的に把握し、下水処理場における NV の消長を明らかにすることを研究目的とした。

処理水を 10L ずつ採取し、その日のうちに実験室へ持ち帰り 10℃の恒温室に保管した。

なお、2001 年度時点における調査対象 A 地区の下水普及率は 62.8%（下水普及率=処理区域内人口 10,674 人／行政区内人口 16,990 人）で、下水処理は OD 法により行われており、下水の排除方式は分流式で処理量は 5,700m³/日であった。

B. 研究材料と方法

県内の A 地区の下水処理場において 2003 年 2 月から 3 月にかけて 2 週間に 1 回（計 3 回）、2003 年 11 月から 2004 年 10 月にかけて月 1 回（計 12 回）の検体採取を行った。検体は、流入下水、下水

1. ウイルス濃縮方法

（1）流入下水からのウイルス濃縮方法

流入下水からのウイルスを検出するため、以下に述べる方法により NV を誘出・濃縮した。検体 400ml を 9,000×g, 4℃, 15 分間遠心分離し、上清を滅菌済み

500ml ガラス瓶に移した。沈渣からのウイルス誘出には Enzymatic Virus Elution method (EVE 法)を用いた。遠心上清及び EVE 法により得られた沈渣からの誘出検体にポリエチレングリコール 6000 を終濃度 8%に加え、magnetic stirrer を用いて 4°Cで一晩攪拌した。攪拌後、遠心管 8 本に流し込み、9,000×g, 4°C, 90 分間遠心分離し、沈渣を 0.15M リン酸バッファー (pH: 9.0) 4ml 中に分散させた。十分に分散後、さらに 9,000×g, 4°C, 10 分間遠心分離し、上清を pH7.0 に調整して検体とした。

(2) 下水処理水からのウイルス濃縮

下水処理水からの NV 検出を行うため、以下に述べる方法により NV を濃縮した検体 1L に対してポリエチレングリコール 6000 を終濃度 10% (w/v) に加え、さらに塩化ナトリウムを終濃度 2.34% (w/v) に加えた。その後、magnetic stirrer を用いて 4°Cで一晩攪拌した。攪拌後に遠心管へ流し込み、10,000×g, 4°C, 30 分間遠心分離し、沈渣を滅菌 MilliQ 水に分散した。十分に分散後、さらに 10,000×g, 4°C, 10 分間遠心分離し、上清をウイルス濃縮検体とした。

2. NV 検出方法

検体からの NV 遺伝子の検出については、厚生労働省医薬食品局食品安全部がとりまとめた「ノロウイルスの検出法」に準拠し、リアルタイム PCR により行った。

NV の RNA 抽出は QIAmp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いた。DNase 処理後、Super Script II RT (Invitrogen) を用いて逆転写反応を行った。逆転写反応はランダムプライマーを用い、反応は 42°C で 60 分間行った。反応終了後、逆転写酵素を失活するために 99°C、5 分間加熱し、直ちに氷中で冷やした。次に Taq Man

Universal Master MIX と Taq Man プローブを用い、リアルタイム PCR を行った。リアルタイム PCR に用いたプライマー及びプローブは、NV の遺伝子群 GI に対しては COG1F 及び COG1R と RING1-TP (a)、TP (b)、遺伝子群 G II に対しては COG2F 及び COG2R と RING2-TP である。

C. 研究結果および考察

1. 流入下水

図 1 に A 地区下水処理場での流入下水中の NV 遺伝子数を示した。15 回の調査のうち 2004 年 5 月 26 日、同年 9 月 1 日、15 日及び 2004 年 10 月 20 日に採取した検体を除く 11 回の検体から NV 遺伝子が検出され、検出率は 73.3% (11/15) であった。流入下水から検出された NV 遺伝子数は、2003 年 11 月 28 日は 48 コピー/ml であったが、12 月 12 日と 2004 年 1 月 15 日はそれぞれ 1,732 コピー/ml 及び 13,873 コピー/ml と調査期間中では最も高い値であった。2 月 29 日と 3 月 14 日の検体からは各々 509 コピー/ml と 1,425 コピー/ml 検出された。それに対し前年の同時期である 2003 年 2 月 24 日、同年 3 月 10 日、24 日に採取した検体からはそれぞれ、305 コピー/ml、37 コピー/ml 及び 57 コピー/ml 検出され、全体的に低い値であった。次に、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。

検出された遺伝子群は、2003 年 12 月 12 日、2004 年 1 月 15 日の検体から、G II 群がそれぞれ 100%、94.6%と多くを占めたのに対し、2004 年 2 月 29 日、3 月 14 日の検体では G I 群が 89.3%、63.4%と多かった。この原因の解明には至らなかったが、2002 年の 2 月下旬から 3 月上旬に県北の小学校で流行した感染性胃腸炎の患者便から検出された NV の遺伝子群

は、すべて GI 群であった事例が確認されており、時期的に検出される遺伝子群の優先性に違いがある可能性も考えられた。さらに、非常に興味深いことに、NV による感染性胃腸炎の非流行期と考えられる 2004 年 6 月 15 日と同年 7 月 27 日に

採取した流入下水から、それぞれ 1ml 当たり 9 コピーと 24 コピーの NV 遺伝子を検出した。この結果により、従来 NV による感染性胃腸炎の非流行期と考えられていた夏季にも流行のあったことが推測された。

▨ 下水上清 (NV GI) ▩ 下水沈渣 (NV GI) □ 下水上清 (NV GII) ■ 下水沈渣 (NV GII)

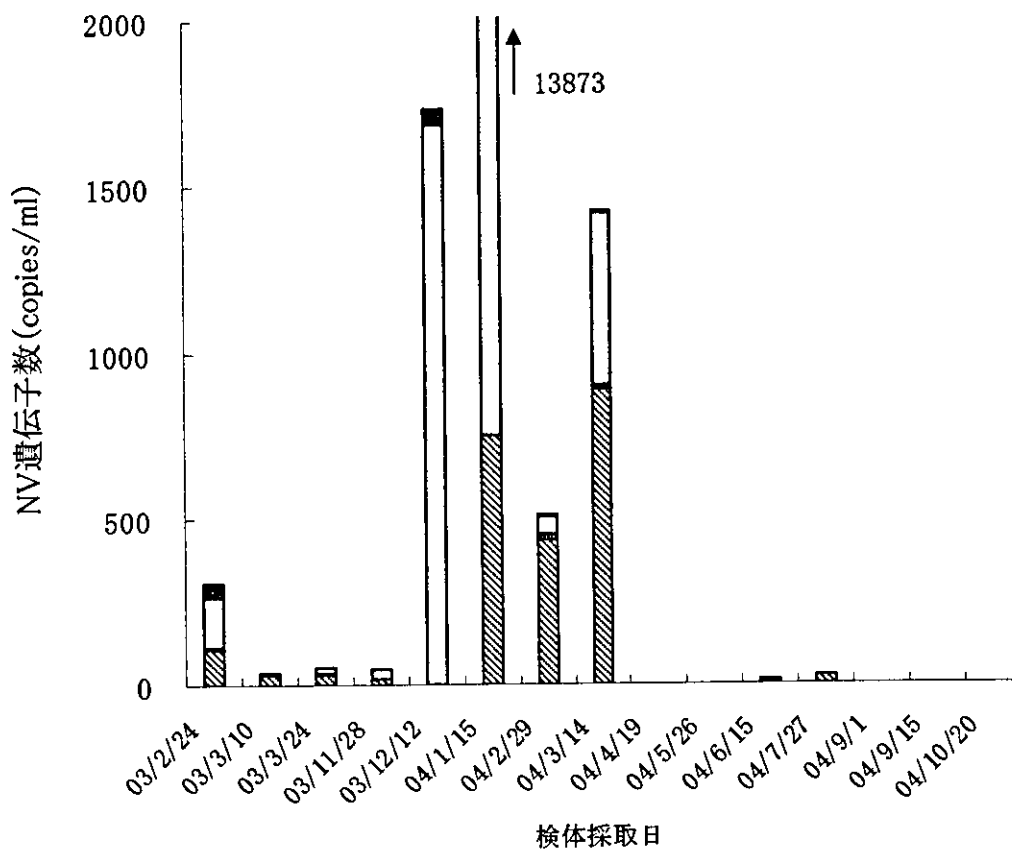


図1. 下水処理場における流入下水中のNV遺伝子数

2. 下水処理水

図2に下水処理水中におけるNV遺伝子の定量検出結果を示した。2003年2月24日採取の検体中には1ml当たり約80コピーのNV遺伝子が含まれていたが、その約2週間後及び4週間後に採取した検体からは検出されなかった。

2003年度においては、11月28日採取の検体からはNV遺伝子が検出されず、12月12日採取の検体から2コピー/mlが検出されて以降、徐々に下水処理水中のNV遺伝子数の増加が確認された。高濃度にNV遺伝子が検出された2003年2月と比

べ、2004年2月は約4分の1の21コピー/mlという値であった。また2004年3月でも23コピー/ml(91.3%が遺伝子群G I)の濃度で、1年前のNV遺伝子定量検出結果とは異なる傾向であった。これらのことから、NVによる感染性胃腸炎の流行規模や期間は、流入下水や下水処理水から検出されるNV遺伝子数からも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NV遺伝子が検出されたことにより、従来のOD法では、十分に除去できないNVの存在が明らかになった。

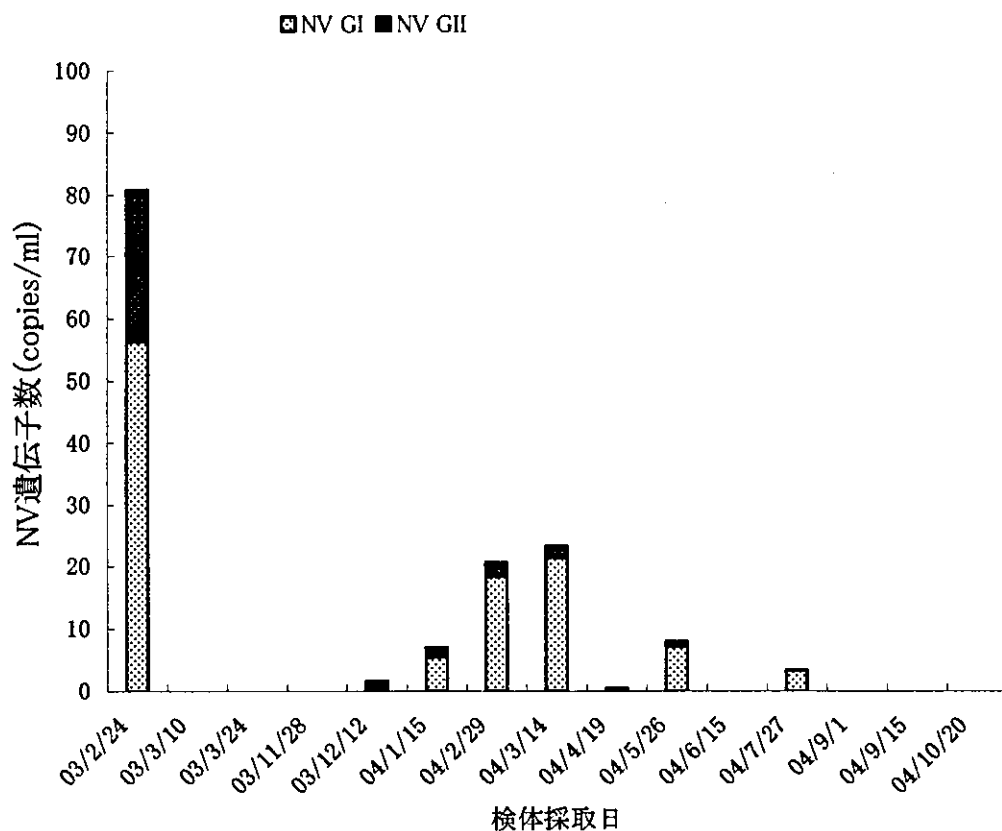


図2. 下水処理水中におけるNV遺伝子数

D. 結論

下水処理場での流入下水中から検出された遺伝子群は、2003年12月、2004年1月ではGⅡ群が多く、2004年2月、3月ではGⅠ群が多く、時期的に検出される遺伝子群の優先性に違いがある可能性が考えられた。

下水処理水中におけるNV遺伝子の定量検出結果を2003年と2004年で月ごとに比較した結果、NV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NV遺伝子が検出されたことから、従来のOD法では、十分に除去できないNVの存在が明らかになった。

E. 研究発表

学会発表

西田知子、野田衛、大瀬戸光明、三上稔之、篠原美千代、入谷展弘、植木洋、川本歩、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、日本食品衛生学会第88回学術講演会、広島、2004年11月11-12日

西田知子、野田衛、三上稔之、篠原美千代、大瀬戸光明、入谷展弘、植木洋、吉澄志磨、岩田祐之、西尾治：3シーズンにおける国内産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52回日本ウイルス学会、横浜、2004年11月21-23日

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）
分担研究報告書

ウイルス性食中毒の予防に関する研究
分担研究項目：カキ養殖海域のウイルス汚染について

分担研究者 西尾 治 国立感染症研究所感染症情報センター
研究協力者 吉澄 志磨 北海道立衛生研究所感染症センター微生物部

研究要旨

カキ養殖海域への下水の流入と、海水およびカキにおけるウイルス汚染についての関連性を確認するため、下水、海水およびカキについてノロウイルス (NV)、海水およびカキについて A 型肝炎ウイルス (HAV) の検出を行った。さらに、下水処理場の NV 処理能力について把握するため、流入水、流調槽水、余剰汚泥、塩素処理水およびレキろ過水について、NV 量の測定を行った。その結果、処理場 a の流入下水からは年間を通して NV が検出されたが、夏季の NV 量は冬季に比べて少なく、また夏季の放流水からは NV は検出されなかった。しかし、流入水中のウイルスコピー数が多い時期は、流入から放流の過程で NV 量の減少がほとんど認められなかった。処理場 b では、流入下水から NV が検出されなかった 7、9、10 月にも、流調槽水や余剰汚泥からは 10^3 コピー/L 以上の NV が検出された。このことから、下水処理過程で活性汚泥に NV が吸着し沈殿することにより、放流水中の NV 量が流入水よりも減少するのではないかと考えられた。処理場における NV 除去率は、処理場 a で 10^{-1} 程度、処理場 b では 10^{-3} 以上であり、処理施設により大きく異なっていた。海水からは 2 月に 1 定点から NV が検出されたが、それ以外の海水とカキからは、NV、HAV ともに検出されなかった。下水から検出された NV の遺伝子型を調べたところ、GI では Chiba 類似株がもっとも多く検出され、GII では 5～10 月にかけては Bristol 類似株が、11 月以降は Mexico 類似株が多く検出された。定点 B-1 の海水からは、同じ時期の下水において優勢株であった Mexico 類似株が検出された。

A. 研究目的

カキの NV 汚染は、ヒト糞便由来の NV が養殖海域に流入しカキの中腸腺に蓄積されることにより起こると考えられている。そこで、養殖海域への下水の流入と、海水およびカキにおける NV 汚染についての関連性を確認するため、下水、海水およびカキについて、NV の定量的調査を行った。また、海水およびカキについては、NV と同様ヒト糞便由来と考えられる HAV の汚染状況についても調査を行った。さらに、下水処理場における NV 処理能力

について把握するため、下水処理場の各処理過程でどの程度 NV が減少しているかについて、詳細な検討を行った。

B. 研究方法

1. 調査定点

北海道オホーツク海側のカキ養殖海域に A、B-1、B-2、C の 4 定点を設置した。定点 A、B は 12 月（海面結氷前）までのカキ養殖海域であり、例年 12 月以降はすべてのカキが定点 C に移動される。今回は定点 A、B に調査用カキを残し、結氷後