

厚生労働科学研究費補助金
食品の安心・安全確保推進研究事業

ウイルス性食中毒の予防に関する研究

平成 18 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 武田 直和

平成 19 (2007) 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. カキ摂食によるノロウイルス食中毒のリスクアセスメントの 試みPart I	春日 文子 11
2. カキ摂食によるノロウイルス食中毒のリスクアセスメントの 試みPart II ノロウイルス食中毒のDose-Response曲線の推測	春日 文子 25
3. 紀伊半島における野生動物のHEV保有調査	田中 智之 39
4. 愛知県内の下水処理場流入水からの腸管感染ウイルス の検出状況	小林 慎一 47
5. E型肝炎ウイルスの熱安定性と当該ウイルス遺伝子型1の 豚における感染性	恒光 裕 55
6. 家畜の抗体調査と汚染実態調査	有川 二郎 61
7. A型肝炎ウイルス（HAV）のRT-LAMP法による 迅速遺伝子診断	米山 徹夫 65
8. ヤマトシジミからのHEV遺伝子の検出	李 天 成 73

III. 協力研究報告書

1. 協力研究総括報告	田中 智之 77
2. 2006/07シーズンのノロウイルスによる食中毒事例の 発生状況	吉澄 志磨 81

3. 青森県における集団発生からのノロウイルス検出と 遺伝子型 (2005.9~2006.5)	三上 稔之	91
4. カキ養殖海域周辺の汚水処理施設における ノロウイルスの消長	高橋 朱実	101
5. ノロウイルス (NoV) による感染性胃腸炎の宮城県内での 流行に関する考察	植木 洋	109
6. 富山県における感染性胃腸炎の事例について	滝澤 剛則	113
7. 2006年4月~12月の福井県内におけるノロウイルス検出状況	東方 美保	119
8. 市販生カキからのノロウイルス遺伝子検出状況	内野 清子	125
9. サポウイルスに対する単クローン抗体の作製とその応用	北元 憲利	131
10. ヒトとカキから検出したノロウイルスの関連および 集団事例から検出したノロウイルスの特徴	福田 伸治	135
11. 2006年非流行期に広島市でノロウイルス集団感染が 継続した要因	野田 衛	141
12. 感染性胃腸炎および調理施設等からのノロウイルスの 検出と塩素剤消毒の効果	近藤 玲子	149
13. 下水処理施設における流入水及び処理水の ノロウイルスの消長	船津丸 貞幸	161
14. 九州5自治体におけるノロウイルスの分子疫学的解析	松岡 由美子	171

IV. リスクプロファイル

1. A型肝炎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 米山 徹夫185
2. E型肝炎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 武田 直和191
3. 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201

V. 研究成果の刊行に関する一覧

厚生労働科学研究費補助金

食品の安心・安全確保推進研究事業

ウイルス性食中毒の予防に関する研究

平成 18 年度 総括研究報告書

主任研究者 武田 直和

平成 19 (2007) 年 4 月

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）
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 RT-LAMP 法による A 型肝炎ウイルス遺伝子迅速検出法を検討し、指摘条件を確立した。これまで得られたデータ、および文献を参照し、A 型肝炎ウイルス感染のリスクアナリシスのためのリスクプロファイルを作成した。E 型肝炎ウイルスのレザーバーと考えられるシカ、イノシシについて、地域ごとに食肉利用の目的で捕獲される個体の抗体を調査した。同時に、RT-PCR によりウイルス遺伝子を確認し、塩基配列の解読、分子系統解析系で遺伝子型を同定した。豚についても同様に行なった。ブタの感染実験から発症ウイルス量を推定した。これまで得られたデータ、および文献を参照し、E 型肝炎ウイルス感染のリスクアナリシスのためのリスクプロファイルを作成した。既に確立したノロウイルスリアルタイム PCR 法用い、地方衛生研究所の協力の下、食品の汚染実態調査を行った。また、食品調理従事者の不顕性感染の実態調査を行った。組換え中空粒子を抗原として作製した抗血清で各血清型に対応したイムノ磁気ビーズを作製し、食品に含まれるノロウイルスの濃縮法を検討した。濃縮効率も RT-PCR で検証した。これまで得られたデータ、および文献を参照し、ノロウイルス感染のリスクアナリシスのためのリスクプロファイルを作成した。カキ摂食によるノロウイルス食中毒のリスクアセスメントモデルを作成した。

分担研究者		宮崎 綾子	同上
春日 文子	国立医薬品食品衛生研究所	吉井 雅晃	同上
田中 智之	堺市衛生研究所	服部奈千子	同上
小林 慎一	愛知県衛生研究所	松浦友紀子	北海道大学
恒光 裕	動物衛生研究所	吉松 組子	同上
有川 二郎	北海道大学	太田 嘉則	栄研化学
米山 徹夫	同上	吉澄 志磨	北海道立衛生研究所
李 天成	同上	石田勢津子	同上
		池田 徹也	同上
協力研究者		奥井 登代	同上
鈴木 穂高	国立医薬品食品衛生研究所	三上 稔之	青森県環境保健センター
内野 清子	堺市衛生研究所	石川 和子	同上
三好 龍也	同上	熊谷 邦彦	同上
皆川 洋子	愛知県衛生研究所	高橋 朱実	岩手県環境保健研究センター
山下 照夫	同上	高橋 雅輝	同上
伊藤 雅	同上	蛇口 哲夫	同上
長谷 聡子	同上	植木 洋	宮城県保健環境センター
長谷川晶子	同上	滝澤 剛則	富山県衛生研究所
池田 秀利	動物衛生研究所	小原 真弓	同上

長谷川澄代	同上
岩井 雅恵	同上
堀元 栄詞	同上
倉田 毅	同上
東方 美保	福井県衛生環境研究センター
北元 憲利	兵庫県立大学環境人間学部
福田 伸治	広島県保健環境センター
野田 衛	広島市衛生研究所
近藤 玲子	愛媛県立衛生環境研究所
豊嶋 千俊	同上
市川 高子	同上
大瀬戸光明	同上
船津丸貞幸	佐賀県衛生薬業センター
平野 敬之	同上
増本 久人	同上
坂本 晃子	同上
松岡由美子	熊本市環境総合研究所
山本 康弘	北九州市環境科学研究所
川本 大輔	福岡市保健環境研究所
小河 正雄	大分県衛生環境研究センター
田代 潔子	同上
長岡 健朗	同上
清原 知子	国立感染症研究所
島崎 典子	同上
戸塚 敦子	同上
白土 東子	同上
GS Hansman	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り、事件数や患者数も正確に把握されるようになってきた。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。

B. 研究方法

(1) HAVのRT-LAMP法

プライマーはPrimerExplorer V3により遺伝子型3Bの細胞馴化株KRM238の5'非翻訳領域の塩基配列を元にして設計した。KRM238、TKM005(1B型)、KRM031(1A型)からQIAamp Viral RNA Mini kit(GIAGEN)でRNAを調製し、RT-LAMP kit(栄研化学)を用いて62.5℃で60分間反応を行い、比濁法によるリアルタイム検出を行った。

(2) HEV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、国立感染症研究所監修)に従い、精製したHEV中空粒子(VLPs)を抗原として96穴マイクロプレートをコーティングし、動物血清を

このマイクロプレート上で2倍階段希釈した。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。

(4) ブタを用いた HEV 感染実験

ノトバイオート豚で2代継代した豚由来 HEV Highland 株（遺伝子型3）を含む肝臓乳剤 [10 (6) 50%豚感染量/ml] を使用した。1ml を生後3日齢のノトバイオート豚に静脈内投与した。定期的に採取した血清、便に含まれる RNA、IgG、IgA を検出した。HEV 抗体の測定は、Li らの報告したウイルス様粒子（VLP）を抗原とした ELISA 法で実施し、血清材料を200倍希釈して使用した。

(5) ノロウイルスの汚染実態調査

地方衛生研究所において①NV 感染症発生の実態、②感染原因（要因）、とくにカキの喫食との関連について、③NV の遺伝子学的特徴、④感染予防に寄与できる手立ての4点について各地衛研の感染事例を中心に解析した。

(6) ノロウイルスリスクアセスメントの作成
カキの摂食による NoV による食中毒についての定量的リスクアセスメントのためのモデルを作成し、シミュレーションソフトウェアである WinBUGS を用いて、NoV 集団食中毒の発生件数の推定を試みた。

（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、個人情報情報を厳格に管理、保存した。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) RT-LAMP 法による A 型肝炎ウイルス遺伝子迅速検出法の確立

検出感度はウイルスの感染価を測定するのとはほぼ同じレベルであり、WHO の参照品から他の RT-PCR 法と遜色ない感度であることが示された。

(2) A 型肝炎ウイルス感染のリスクアナリシスのためのリスクプロファイル

日本は環境衛生の向上で HAV 汚染が世界でも最も少ない地域である。集団食中毒の報告も最近では数える程しかない。環境中の HAV の検出は患者数の少ないことと合わせ非常に困難である。また、A 型肝炎には不活化ワクチンが実用化されている。しかし、日本では殆どは A 型肝炎の感受性者である。これらを踏まえ現状での対策に活用してゆく。

(3) HEV 汚染実態調査

疫学調査から HEV に汚染されている野生イノシシは局所的に存在し、抗体保有率にはかなりの地域差があることが考えられた。一方、ニホンジカの HEV 保有頻度は大変低いことが確認された。今後食用として野生イノシシやニホンジカの有効活用を促進する際の定期的、地域単位のサーベイランスへの活用が期待される。自然環境の HEV の汚染状況を把握するためヤマトシジミから HEV 遺伝子の検出を試みた。3型 HEV 遺伝子が検出され日本の一部の河川水は HEV に汚染されていることが示さ

れた。

(4) HEV 感染実験

HEV の熱安定性を調べるため、HEV [遺伝子型 3 ; 10 (6) 50%豚感染量/ml] を 56℃30 分処理した後、ノトバイオト豚 3 頭に静脈内接種して 14~28 日間観察した。その結果、HEV は 56℃30 分の熱処理では感染性を失わないことが明らかになった。発展途上国におけるヒト流行型 HEV の豚での感染性を明らかにするために、ノトバイオト豚 4 頭に遺伝子型 1 の HEV [10 (5) 50%サル感染量/ml] を静脈内接種し、2 頭は接種後 3 週で解剖検査、残り 2 頭は接種後 9-20 週間経過観察を行った。その結果、いずれの豚も糞便ならびに血清中に HEV RNA は検出されなかった。

(5) E 型肝炎ウイルス感染のリスクアナリシスのためのリスクプロファイル

イノシシ肉とシカ肉ではヒトへの感染が報告されている。間接的ではあるがブタからヒトへの感染もある。E 型肝炎は人獣共通感染症の観点から捉える必要性が強い疾患である。幸い検査法は確立できているので汚染状況をさらに詳細に解析し、リスクアナリシスに活用してゆく。

(6) ノロウイルス汚染実態調査

2006/2007 年シーズンのノロウイルスの流行は例年より少なくとも 1 ヶ月早く始まった。感染拡大は多くの事例においてヒト-ヒト感染によるものであった。遺伝子解析から流行の主たる遺伝子型は GII/4 によるものであることが判明した。また、過去の cluster に属さない変異株が出現していることが明らかになった。

(7) ノロウイルス感染のリスクアナリシスのためのリスクプロファイル

これまで明らかになったノロウイルスのウイルス学的な特徴、公衆衛生学上の問題点、食中毒の特徴、医学経済学的インパクト、製造、加工、流通、摂取に影響する要素、リスクアセスメントの必要性とリスクアセッサへの質問提起等について、ウイルスが関与する食品安全上の問題点を、その介在食品や公衆衛生上の影響、経済的影響をも含めて、総合的に記載した。

(8) カキ摂食によるノロウイルス食中毒のリスクアセスメントの試み

「カキの消費量×カキの汚染率×変数=ノロウイルス食中毒件数」という式を用い、国内産生食用カキの出荷時期である 10 月~3 月に限ってシミュレーションを行うとシミュレーション値が実際の事件数とかなり近いものとなった。また、仮定の Dose-Response 曲線に基づき、シミュレーションを行い真の Dose-Response 曲線を推測するという試みを行ったところ、ノロウイルス食中毒件数、あるいは患者数いずれの場合もノロウイルス量に関係なく発症率が一定であった。

D. 考察

(1) RT-LAMP 法による遺伝子迅速検出法

HAV の細胞馴化株を使って RT-LAMP 法の検出法を確立した。検出感度は他の RT-PCR 法と遜色ない感度であり、廉価、簡便、迅速なことから臨床検体のスクリーニングや医薬品のウイルスバリデーションへの適用が期待される。

(2) HEV 感染実験

HEV は 56℃30 分の熱処理では感染性を失わない。したがって、食肉由来 HEV 感染の防御には十分な加熱が重要である。今後のリスクプロファイルに活用したい。また、豚は遺伝子型 1 の HEV に対する感受性が極めて低いことが明らかになった。今後、ブタに対するワクチン対策や公衆衛生対策に活用してゆく。

(3) HEV 汚染実態調査

ニホンジカにおける HEV 抗体保有頻度は低く、ニホンジカが HEV の感染源となる危険性は低いという結果が支持された。また、イノシシの抗体陽性率には地域間で違いがみられ、イノシシの抗体保有率にはかなりの地域差があることが示唆された。サンプリングを行う場所やどのような個体をサンプリングするかで、その地域の抗体保有率およびウイルス陽性率に影響を及ぼすことが考えられた。

(4) ノロウイルス汚染実態調査

ノロウイルスの感染予防には、まずウイルス学的診断が必須であるが、これまで ELISA 法が唯

一診断方法として厚生労働省より認可されている。しかし、検査方法として普遍化している RT-PCR 法に比べるとその感度は低く、簡便、経済的かつ迅速な診断的価値をもつ ELISA 法の感度を高めなければならない。感染拡大予防には、初期の嘔吐物や糞便の処理・消毒が重要である。ベストな消毒方法を確立しなければならない。汚染カキによる感染事例が激減していたが、これは、決してカキが清潔になったことを意味するのではない。環境中にはノロウイルス遺伝子が検出されており、安全・安心なカキ流通のために、ノロウイルスを不活化する下水処理過程を、関係部署と協議・検討しなければならない。

(5) ノロウイルスリスクアセスメントモデル
汚染カキの消費量とノロウイルス食中毒件数に比例関係があるということは、ノロウイルス食中毒のすべてがカキが原因であることを意味するものではなく、カキが原因食品の事例が常に一定の割合で含まれていることを示していると思われた。

E. 結論

- ・LAMP 法による HAV の遺伝子迅速検出法を確立した。
- ・HEV は、56℃30 分の熱処理では感染性は消失しない。
- ・豚は遺伝子型 1 の HEV に対する感受性が極めて低い
- ・ニホンジカにおける HEV 抗体保有頻度は低く、ニホンジカが HEV の感染源となる危険性は低い。
- ・イノシシの抗体陽性率には地域間で違いがみられた。
- ・日本の一部の河川水は HEV に汚染されていることが示された。
- ・「カキの消費量×カキの汚染率×変数＝ノロウイルス食中毒件数」という式を用い、国内産食用カキの出荷時期である 10 月～3 月に限ってシミュレーションを行うと実際の事件数とかなり近い値になった。
- ・ノロウイルス量に関係なく、発症率が一定であるという Dose-Response 曲線が数学的に最も符合した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Fukuda S, Takao S, Kuwayama M, Shimazu Y, Miyazaki K: Rapid detection of norovirus from fecal specimens by real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay. *J. Clin. Microbiol.*, 44, 1376-1381, 2006.

Fukuda S, Kuwayama M, Takao S, Shimazu Y, Miyazaki K: Molecular epidemiology of subgenus F adenoviruses associated with pediatric gastroenteritis during eight years in Hiroshima Prefecture as a limited area. *Arch. Virol.*, 151, 2511-2517, 2006.

Kiyahara T, Sato S, Totsuka A, Miyamura T, Ito T, Yoneyama T: Shifting seroepidemiology of hepatitis A in Japan, 1973-2003. *Microbiol. Immunol.* 2006;51:185-191

Li T-C, Miyamura T, Takeda N: Detection of hepatitis E virus RNA from the bivalve Yamato-Shijimi (*Corbicula japonica*) in Japan. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2007;76:170-172.

Li T-C, Saito M, Ogura G, Ishibashi O, Miyamura T, Takeda N: Serological evidence for hepatitis E virus infection in mongoose. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2006;74:932-936.

Nakai I, Kato K, Miyazaki A, Yoshii M, Li TC, Takeda N, Tsunemitsu H, Ikeda H: Different fecal shedding patterns of two common strains of hepatitis e virus at three Japanese Swine farms. *Am J Trop Med Hyg* 2006;75:1171-1177.

Mochizuki M, Ouchi A, Kawakami K, Ishida T, Li TC, Takeda N, Ikeda H, Tsunemitsu H:

- Epidemiological study of hepatitis E virus infection of dogs and cats in Japan. *Vet Rec* 2006;159:853-854.
- Tsugawa T., Numata-Kinoshita K., Honma S., Nakata S., Tatsumi M., Sakai Y., Natori K., Takeda N., Kobayashi S. and Tsutsumi H.: Virological, Serological, and Clinical Features of an Outbreak of Acute Gastroenteritis Due to Recombinant Genogroup II Norovirus in an Infant Home. *J. Clin. Microbiol.* 44: 177-182, 2006.
- Tomoyuki Tanaka, Noritoshi Kitamoto, Xi Liang, and Mary K. Estes: High efficiency cross-reactive monoclonal antibody production by oral immunization with recombinant Norwalk virus-like particles. *Microbiol. Immunol.* 2006; 50:883-888
- Miyoshi T, Uchino K, Matsuo M, Ikeda Y, Yoshida H, Sibata H, Fujii F and Tanaka T. Characterization of Norovirus outbreaks during a non-epidemic season. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2006; 59:140-141
- Uchino K, Miyoshi T, Matsuo M, Ikeda Y, Yoshida H, Teranaka Y, Sugimoto M, Sakai Y, Sibata H, Fujii F and Tanaka T. Combined genogroup I and II Norovirus infection at a nursery. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2006; 59; 2007-272
- Okada M, Tanaka T, Oseto M, Takeda N, Shinozaki K: Genetic analysis of noroviruses associated with fatalities in healthcare facilities. *Arch Virol* 2006;151:1635-1641.
- Hansman GS, Natori K, Shirato-Horikoshi H, Ogawa S, Oka T, Katayama K, Tanaka T, Miyoshi T, Sakae K, Kobayashi S, Shinohara M, Uchida K, Sakurai N, Shinozaki K, Okada M, Seto Y, Kamata K, Nagata N, Tanaka K, Miyamura T, Takeda N: Genetic and antigenic diversity among noroviruses. *J Gen Virol* 2006;87:909-919.
- 長谷川澄代、小原真弓、岩井雅恵、滝澤剛則、倉田 毅：富山県におけるウイルス性胃腸炎の集団発生について(平成16-17年度)、*日本公衆衛生雑誌*、53、889、2006.
- 北元憲利. 食品微生物の検出法の最新技術. *New Food Industry.* 48(3): 11-20, 2006.
- 田中智之、三好龍也、内野清子、武田直和. 世界的に見たノロウイルスの現状。臨床と微生物 2006; 33:385-391
- 田中智之、三好龍也、内野清子、武田直和. 新興・再興感染症の感染制御の実際 8. ノロウイルス. *治療学* 2006; 40:79-82
- 小林宣道、田中智之. ノロウイルス感染症. *Pharma Medica* 2006;24:21-25
- 伊藤 雅、小林慎一、山下照夫、長谷川晶子、榮 賢司. 野生動物からのE型肝炎ウイルス(HEV)とHEV抗体の検出および猟師らのHEV抗体保有状況、*肝臓* 47(6)316-318, 2006.
- 鈴木穂高、春日文子: カキ摂食によるノロウイルス食中毒のリスク評価の試み. *食品衛生研究*, vol. 56(11) p25-33 (2006)
2. 学会発表
- Kiyahara T., Sato S., Totsuka A., Miyamura T., Ito T., and Yoneyama T. The Shifting Seroepidemiological Pattern of Hepatitis A in Japan, as of 2003. 5th World Congress on Vaccination, Immunization and Immunotherapy. Fairmont The Queen Elizabeth, Montreal, Canada. 6-9 November 2006
- Miyoshi T, Tanaka T, Uchino K, Tian-Cheng Li and Takeda N: Prevalence of Hepatitis E virus in the domestic area of Wakayama and Osaka prefecture. The 6th China Japan International Conference of Virology. June 22-24, 2006, Shanghai, China
- Kamata K, Katoh D, Mangan K, Gondaira F, Hirano M, Satoh S, Sakae K, Kobayashi S, Oseto M, Seto Y, Kitamoto N, Tanaka T, Takeda N: Development of a New ELISA

for Detection of Noroviruses in Stool Specimens. In American Society of Microbiology. 106th General meeting. Orlando, FL, 2006. 5.

吉澄志磨、石田勢津子、奥井登代、岡野素彦：
ヒトーヒト感染によるノロウイルスの胃腸
炎集団発生例における分子疫学的検討、第 54
回日本ウイルス学会学術集会、名古屋市、
2006 年 11 月 19-21 日

東方美保、松本和男、木村吉延：平成 14~17
年度に福井県で検出されたノロウイルスに
ついて 第 54 回日本ウイルス学会学術集会
名古屋、2006 年 11 月

長谷川晶子、伊藤 雅、小林慎一、山下照夫、
榮 賢司、皆川洋子。愛知県内の下水処理
場流入水からのノロウイルス検出状況。第
54 回日本ウイルス学会総会、名古屋、2006.

小原真弓、大矢英紀、尾西 一、東方美保、
猿渡正子、青木 聡、田中保和、柴田伸
一郎、中野陽子、杉山 明、小林慎一、長
谷川晶子、長谷川澄代。平成 17 年度の東
海北陸地区におけるノロウイルスの検出状
況について。第 54 回日本ウイルス学会総会、
名古屋、2006.

三好龍也、内野清子、田中智之：ノロウイルス
感染者のウイルス排泄期間と排出コピー数。
第 54 回日本ウイルス学会学術集会。名古屋、
2006. 11

福田伸治、佐々木由枝、高尾信一、宮崎佳都夫：
リコンビナントおよび GII/4 変異型ノロウイ

ルスの集団感染事例への関与。日本ウイルス
学会第 54 回学術集会 2006 年 11 月 名古屋
野田 衛、西尾 治、伊藤文明、池田義文：ノ
ロウイルス検出におけるアミラーゼ処理の
有用性、日本ウイルス学会第 54 回学術集会、
名古屋市、2006 年 11 月 19~21 日

豊嶋千俊、山下育孝、近藤玲子、大瀬戸光明：
愛媛県内の高齢者入所施設における感染性
胃腸炎の集団発生とノロウイルスの消毒に
ついて、平成 18 年度公衆衛生獣医師協議会
全国調査研究発表会、2006 年 9 月 東京

米山徹夫、清原知子、下池貴志、戸塚敦子：A
型肝炎ウイルス (HAV) の RT-LAMP 法による迅
速診断、第 54 回日本ウイルス学会総会、名
古屋、2006 年.

松浦友紀子、李天成、吉松組子、有川二郎、恒
光裕、高島郁夫、鈴木正嗣、宮村達男、武田
直和、日本に生息するシカの E 型肝炎ウイル
ス抗体保有状況調査、第 54 回日本ウイルス
学会、名古屋 (2006 年 11 月)

鈴木穂高、武田直和、春日文子：カキ摂食によ
るノロウイルス食中毒のリスクアセスメン
ト。第 27 回日本食品微生物学会、堺市、2006
年 9 月

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

食品の安心・安全確保推進研究事業

ウイルス性食中毒の予防に関する研究

平成 18 年度 分担研究報告書

春日 文子
田中 智之
小林 慎一
恒光 裕
有川 二郎
米山 徹夫
李 天成

平成 19 (2005) 年 4 月

平成 18 年度 厚生労働科学研究費補助金 食品の安心・安全確保推進研究事業
「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：カキ摂食によるノロウイルス食中毒のリスクアセスメントの試み Part I

分担研究者 春日文字 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部 第三室長

協力研究者 鈴木穂高 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部 主任研究官

研究要旨

一昨年度、本研究事業において西尾治、武田直和、春日文字によってまとめられた「感染のリスクアナリシスの為のリスクプロファイル」に基づき、昨年度、ノロウイルスの定量的リスクアセスメントを試みたが、シミュレーションによって求めたノロウイルス食中毒の集団発生件数は実際の集団発生件数と大きな乖離があった。このことから、本年度、新たなモデルの構築を試みた。

本年度は「カキの消費量×カキの汚染率×変数＝ノロウイルス食中毒件数」という式を用い、国内産食用カキの出荷時期である 10 月～3 月に限ってシミュレーションを行うという新たなモデルを提示した。このモデルではシミュレーション値が実際の事件数とかなり近いものとなった。しかし、このモデルは構造的に非常に単純であり、より複雑で現実に即したモデルを構築するためには、今後もさらなるデータの収集やモデルの改良が必要であると考えられる。

A. 研究目的

ノロウイルスによる食中毒は、最近の厚生労働省の食中毒発生状況¹⁾によれば、平成 14 年から 17 年に年間 268 件、278 件、277 件、274 件発生しており、患者数も年間 7,961 人、10,603 人、12,537 人、8,727 人に上る(平成 14 年、15 年についてはノロウイルスではなく、小型球形ウイルス)。同期間の厚生労働省の食中毒発生事例²⁾においては、原因食品が生カキ、もしくは十分に加熱されなかったカキであると推定された事例が、平成 14 年 78 件(29.1%)、平成 15

年 68 件(24.4%)、平成 16 年 32 件(11.5%)、平成 17 年 43 件(15.7%)、平均 20.1%と高い割合を占めており、ノロウイルス食中毒におけるカキ摂食の重要性が示唆されている(表 1)。しかし、一方で原因食品が不明とされた事例が平成 14 年 171 件(63.8%)、平成 15 年 189 件(67.7%)、平成 16 年 211 件(75.6%)、平成 17 年 207 件(75.5%)、平均 70.7%と過半数を占めていること、および近年、カキ以外の食品が原因食品と判明した事例が増加傾向にあることには注意する必要がある(表 1)。

我々は、昨年度の本研究において、「カキ摂食によるノロウイルス食中毒のリスクアセスメント」を試みた。昨年度のモデルでは、「カキの消費量×カキのノロウイルス量×変数＝集団発生件数」という関係を仮定し、月別に WinBUGS 上でシミュレーションを行った。カキの消費量として農林水産省消費地水産物流通統計³⁾の10都市中央卸売市場における卸売数量(むき身換算)(月別)、カキのノロウイルス量として下水処理場の処理水中のノロウイルス量(月別)⁴⁾、集団発生件数として病原微生物検出情報の集団発生件数(月別)⁵⁾を用いた。その結果、実際の集団発生件数とシミュレーション値の間には大きな乖離が認められ(図1)、新たなモデルの構築や新たなデータの探索等、大幅な修正が必要であることが確認された。

上記の結果に基づき、本年度の研究においては、新たなモデルの構築を試みた。

B. 研究方法

カキの摂食によるノロウイルス食中毒の定量的リスクアセスメントをより現実近づいたものにするため、昨年度のモデルを見直し、新たなモデルの構築を試みた。シミュレーションには、マルコフ・チェーン・モンテカルロ(MCMC)法用のソフトウェアである WinBUGS を用いた。モデルやデータの詳細は、C. 研究結果に示す。

C. 研究結果

まず、ノロウイルス食中毒とカキの消費量の関係を概観するため、ここ4年間の「ノロウイルス食中毒事例数」と「カキの消費量」を月ごとに同一グラフ上に表示した(図

2)。ノロウイルス食中毒事例数は厚生労働省食中毒発生事例²⁾から、カキの消費量は農林水産省消費地水産物流通統計³⁾の10都市中央卸売市場における卸売数量(むき身換算)から引用した。データは平成14年7月～平成18年6月の4年間を用いた。なお、10都市中央卸売市場における卸売数量は、正確には中央卸売市場に入荷した水産物の量であり消費量ではない。また、対象となっているのは札幌市、仙台市、東京都区部、横浜市、名古屋市、京都市、大阪市、神戸市、広島市、および福岡市の10都市中央卸売市場であり、全国データではない。水産庁のかきの流通実態調査の結果概要⁶⁾によると、平成13年のカキの国内生産量は37,000トン、輸入量は14,892トンと報告されている。平成13年の10都市中央卸売市場における年間卸売数量は16,149トンであり、全体の約3割に相当する。

図2を見ると、「ノロウイルス食中毒事例数」と「カキの消費量」の傾向は概ね一致しており、ノロウイルス食中毒とカキ摂食との強い関係が窺える。そこで、「カキの消費量」と「ノロウイルス食中毒件数」に単純な比例関係を仮定し、「カキの消費量×変数＝ノロウイルス食中毒件数…式①」としてシミュレーションを行った。「カキの消費量」として10都市中央卸売市場における卸売数量(2002年7月～2006年6月の月別平均)、「ノロウイルス食中毒件数」として食中毒発生事例のノロウイルス食中毒事例数(2002年7月～2006年6月の月別平均)を用い、4月～3月まで12ヶ月間をシミュレーションした。シミュレーションの結果から求めたノロウイルス食中毒件数を図3に示

す。図 3 に示したように、実際の事例数とシミュレーション値では特に春(4月～6月)と秋～冬(10月～1月)に大きな乖離が認められた。

式①を用いてシミュレーションを行った結果、「ノロウイルス食中毒件数」は単純に「カキの消費量」に比例するわけではないことが明らかになったため、次にカキのノロウイルス汚染について考慮することにした。カキのノロウイルス汚染について調べた報告は数多く、検査法は RT-PCR 法と real-time PCR 法の 2 つの方法が主流である。同一サンプルを RT-PCR 法と real-time PCR 法により調べている報告も多いが、検査結果が一致しない例も多く、集計するに当たってどちらか一方の検査法のデータのみ絞る必要があった。対象は患者糞便だが、RT-PCR 法と real-time PCR 法を比較した文献⁷⁾では、real-time PCR 法の方が RT-PCR 法よりも高感度であると結論していることから、ここでは real-time PCR 法を用いた文献のみを対象とした。real-time PCR 法には定量性があるが、個々の文献において結果の表記が中腸腺 1g 当たり、中腸腺 1 個当たり、あるいは単に陽性、陰性のみ記載であったりと統一性がなかったことから、ここでは多くの文献を参考とするために汚染量は考慮せず、単に汚染率のみを取り上げた。表 2 に real-time PCR 法を用いて国内産カキのノロウイルス汚染を調べた文献^{8)~11)}をまとめた。表 2 を見ると、4 月から 9 月までは検体数が少なく汚染率の信頼性は高くないが、10 月から 3 月までは汚染率が徐々に上昇していく様子が見られた。そこで、「カキの消費量」に、ここで集

計した月別の「カキの汚染率」を乗じた「汚染カキの消費量」と「ノロウイルス食中毒件数」に単純な比例関係を仮定し、「カキの消費量×カキの汚染率×変数=ノロウイルス食中毒件数…式②」として 4 月～3 月まで 12 ヶ月間をシミュレーションした。シミュレーションの結果から求めたノロウイルス食中毒件数を図 4 に示す。図 4 に示したように、シミュレーション値は、春(4月～6月)には依然として実際の事例数と乖離が認められるが、秋～冬(10月～1月)は実際の事例数にかなり近づいた。

国内産の生食用カキの出荷は 10 月から 3 月にほぼ限られている。このことから、国内産生食用カキの出荷シーズンである 10 月から 3 月とそれ以外の 4 月から 9 月では、人々のカキ摂食の実態、特に生食の頻度や量が大きく異なることが推測される。実際、表 1 に示したノロウイルス食中毒の総件数とカキが原因食品である件数を月別にまとめ直してみると(表 3)、月によりノロウイルス食中毒の原因食品に占めるカキの割合は大きく異なっており、4 月～9 月はカキが原因食品である割合が平均 11.7%であったのに対し、10 月～3 月では平均 21.6%と高い割合を示していた。そこで、上記式②を用いたシミュレーションを 10 月～3 月の 6 ヶ月に限って、再度行った。シミュレーションの結果から求めたノロウイルス食中毒件数を図 5 に示す。図 5 に示したように、12 ヶ月間のシミュレーションを行った際に問題となっていた春(4月～6月)が対象外となったため、シミュレーション値は実際の事例数に近づいている。10 月～3 月のシミュレーション値は最頻値が 235 件(95%信

頼区間 205～266 件)であったが、実際の事例数は平均 220 件(平成 14 年度 238 件、平成 15 年度 201 件、平成 16 年度 247 件、平成 17 年度 194 件)であった。

D. 考察

現時点では、汚染カキの消費量とノロウイルス食中毒件数に数学的な比例関係を仮定してシミュレーションを行っても、特に国内産生食用カキの出荷時期である 10 月～3 月に関しては、実際の事件数との間に著しい不一致が生じることはないということが言えたに過ぎない。汚染カキの消費量とノロウイルス食中毒件数に比例関係があるということは、ノロウイルス食中毒のすべてがカキが原因であることを意味するものではなく、カキが原因食品の事例が常に一定の割合で含まれていることを示していると思われる。

E. 結論

今回、「カキの消費量×カキの汚染率×変数＝ノロウイルス食中毒件数」という式を用い、国内産生食用カキの出荷時期である 10 月～3 月に限ってシミュレーションを行うというモデルを提示した。このモデルにより得られたシミュレーション値は実際の事件数とかなり近いものであった。しかし、このモデルは構造的に非常に単純であり、より複雑で現実に即したモデルを構築するためには、今後もさらなるデータの収集やモデルの改良が必要であると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

誌上発表

1) 鈴木穂高、春日文字：カキ摂食によるノロウイルス食中毒のリスク評価の試み。食品衛生研究、vol. 56 (11) p25-33 (2006)

学会発表

1) 鈴木穂高、武田直和、春日文字：カキ摂食によるノロウイルス食中毒のリスクアセスメント。第 27 回日本食品微生物学会、堺市、2006 年 9 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

I. 謝辞

藤井建夫氏(東京海洋大学)、丸山務氏((社)日本食品衛生協会)、一色賢司氏(北海道大学大学院)、朝倉宏氏(国立医薬品食品衛生研究所)、窪田邦宏氏(国立医薬品食品衛生研究所)、田中宏輝氏、都筑はるみ氏に、資料やデータの整理とデータに関する助言をいただいたこと、並びに、リスクアナリシス・コンサルティング会社 Vose Consulting の David Vose 氏、Huybert Groenendaal 氏、Timour Koupeev 氏に、モデル作成に協力をいただいたことに対して深謝する。

参考文献

- 1) 厚生労働省：食中毒発生状況
- 2) 厚生労働省：食中毒発生事例
- 3) 農林水産省：消費地水産物流通統計
- 4) 西尾治他：カキ養殖海域のウイルス汚染について、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,
pp59-68, 2005
- 5) ノロウイルス感染集団発生 2003 年 9
月～2005 年 10 月, 病原微生物検出情
報, vol. 26, p323-325, 2005
- 6) 水産庁：かきの流通実態調査の結果概
要, 2003
- 7) 入谷展弘他：リアルタイム PCR 法を用
いた Norwalk Virus 検出法の評価, 大
阪市立環境科学研究所報告, vol. 64,
p6-10, 2002
- 8) 西香南子：海域および食品のウイルス
汚染状況調査・研究, 厚生労働科学研
究費補助金 食品・化学物質安全総合研
究事業 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 平成
14 年度 総括・分担研究報告書,
pp67-79, 2003
- 9) 西尾治他：カキ養殖海域におけるノロ
ウイルスの定量的定点観測について,
厚生労働科学研究費補助金 食品・化学
物質安全総合研究事業 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 平成 14 年度 総括・分担研究
報告書, pp43-55, 2003
- 10) 福田伸次他：カキ養殖海域におけるノ
ロウイルスの定量的定点観測について,
厚生労働科学研究費補助金 食品・化学
物質安全総合研究事業 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 平成 14 年度 総括・分担研究
報告書, pp43-55, 2003
- 11) 西尾治他：市販生カキおよび食中毒原
因食材あるいは有症苦情カキにおける
ノロウイルス汚染について, 厚生労働
科学研究費補助金 食品・化学物質安全
総合研究事業 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
平成 14 年度 総括・分担研究報告書,
pp19-26, 2003

表1 ノロウイルス食中毒の原因食品

	総件数	推定原因			総件数に対する割合			原因不明を除いた割合	
		牡蠣	牡蠣以外	不明	牡蠣	牡蠣以外	不明	牡蠣	牡蠣以外
2002年(平成14年)	268	78	19	171	29.1%	7.1%	63.8%	80.4%	19.6%
2003年(平成15年)	279	68	22	189	24.4%	7.9%	67.7%	75.6%	24.4%
2004年(平成16年)	279	32	36	211	11.5%	12.9%	75.6%	47.1%	52.9%
2005年(平成17年)	274	43	24	207	15.7%	8.8%	75.5%	64.2%	35.8%
平均	275	55.3	25.3	194.5	20.1%	9.2%	70.7%	68.6%	31.4%

表2 牡蠣の月別ノロウイルス汚染率

	参考文献	8					9				10				11		計	陽性率
		A地域	B地域	C地域	D地域	E地域	市場	A地域	B地域	C地域	H海域	M内湾	M外湾	生食用	生食用	加熱用		
1月	陽性数	4	5	10	7	6	18	5	14	7	0			11	7	94	30.82%	
	検体数	15	15	15	15	15	48	10	30	10	6			119	7	305		
2月	陽性数	4	4	7	3	2	19	0	10	5	2		0	6	1	63	22.91%	
	検体数	10	10	10	10	10	49	20	40	20	6		8	73	9	276		
3月	陽性数	2	0	1	0	1	12						2	1	19	31.67%		
	検体数	5	5	5	5	5	18						8	9	60			
4月	陽性数												0		0	0.00%		
	検体数												2		2			
5月	陽性数										0	1				1	16.67%	
	検体数										3	3				6		
6月	陽性数										0	0				0	0.00%	
	検体数										3	2				5		
7月	陽性数										0	1				1	16.67%	
	検体数										3	3				6		
8月	陽性数										0	0				0	0.00%	
	検体数										3	3				6		
9月	陽性数										0	0				0	0.00%	
	検体数										3	3				6		
10月	陽性数						1	0	0	0	0	0		0	0	1	1.92%	
	検体数						3	5	10	5	3	3		25		52		
11月	陽性数						5	0	0	0	1	1	1	0		8	5.71%	
	検体数						44	5	10	5	6	3	3	54		140		
12月	陽性数	0	0	0	0	0	7	3	6	3	3	0	0	4	5	31	15.58%	
	検体数	5	5	5	5	5	42	5	10	5	6	3	3	92	8	199		