

発生事例、及び地域における散発性胃腸炎患者についても、リアルタイムに NV 等の検索を行い、検出された NV については遺伝子解析を行い、輸入食品との関連及び集団発生の原因ウイルスと地域に流行しているウイルスとの関連について分子疫学的解析を加えた。

B. 研究方法

検査材料：平成 18 年 5 月から 19 年 2 月の間に、愛知県北部市場に搬入された輸入貝類 40 ロットを買上げして用いた。貝類は中腸腺約 1g を検査に供した。中腸腺約 1g はアカガイでは 1~2 個、ハマグリでは 3~4 個、カキでは 1~3 個に相当した。なお、1 ロットにつき 3 検体ずつ検査を行った。また、食中毒等胃腸炎集団発生の原因検索のため、患者、調理従事者等の糞便を用いた。また、一部事例では施設のふき取り、食材についても検査を行った。地域社会での NV 流行の継続的監視は、感染症発生動向調査の一環として採取した散発性胃腸炎患者の糞便を用いた。

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 1~2 g を、10 ml の PBS で乳剤とし、10,000 回転 20 分冷却遠心上清を HCFC141b で処理し、得られた水相を 30% 蔗糖クッションに重層し、38,000rpm で 2 時間超遠心後、沈渣を 200ml 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 High Pure RNA Kit (Roche) 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 及び Nested RT-PCR で行った。リアルタイム PCR は COGF/R primer と RING-TP probe を用い、ABI PRISM 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。Nested RT-PCR は 1st PCR に genogroup 1(G1)用とし

て COG1F/G1SKR primer を、genogroup2 (G2) 用として COG2F/G2SKF primer を用い、Nested PCR primer は SKF/R を用いた。

HAV 遺伝子検出：HAV はリアルタイム PCR 及び Nested RT-PCR を行った。リアルタイム PCR は、西尾が設定した HAV449 primer と HAV557 primer を用いた TaqMan Probe 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。Nested RT-PCR には、戸塚らの primer HAV2799/3273 及び HAV2907/3162 を用いた。

NV, HAV の遺伝子解析：陽性となった検体については国立感染症研究所（西尾博士、木村博士）に依頼し、ABI Genetic analyzer 310 を用い、PCR 産物のダイレクトシーケンス法で遺伝子塩基配列を決定した。得られた遺伝子塩基配列のうち NV についてはカプシド領域部分、HAV については VP1/2A 領域部分について、NJ 法により系統樹解析を行った。

C. 研究結果

1) 輸入貝類からのウイルス検出状況

平成 18 年度に購入された輸入貝類計 40 ロットについて、NV 及び HAV の検査を行った（表 1）。輸入国別では、韓国産はアカガイ 16 ロットとハマグリ及びカキが 1 ロットずつ、中国産はアカガイ 17 ロットとハマグリ 1 ロット、ロシア産はアカガイ 4 ロットであった。表 2 に陽性となった検体一覧を示した。NV は、中国産アカガイ 4 ロット（陽性率 23.5%）、韓国産アカガイ 2 ロット（12.5%）及びロシア産アカガイ 1 ロット（25.0%）から検出された。HAV は中国産アカガイ 1 ロットから検出された（5.9%）。ハマグリ、カキからはウイルスは検出されなかった。中国産アカガイから比較的高率に NV が検出されているものの、これらの値は、過去の調査と比較しても、低い結果となった。なお、検出された NV は G1 が 3 ロット、G2 が 5 ロットで、

そのうち G1 と G2 重複例が 1 ロットあった。

HAV が検出された中国産アカガイからは NV も検出された。

月別の NV と HAV の検出結果を図 1 に示した。冬から春にかけてのウイルス流行期だけでなく、年間を通じて散発的に検出された。

リアルタイム PCR における NV 陽性例のテストチューブ当たり (cDNA 4 μ l) の NV コピー数が定量可能な 10 コピー以上を示したのは 1 例のみであり、その他の陽性例はリアルタイム PCR では 10 コピー以下であったか、もしくは Nested RT-PCR でのみ陽性であった。これらのことは、多くの NV 陽性貝に含まれているウイルス量は微量であることを示していると考えられた。

RT-PCR で陽性となった NV 検体については、現在までに 4 例シーケンスを行ったが、そのうち 2 例については解析不能で、複数の遺伝子型が混在していた可能性が示唆された。解析可能であった 2 例については、参照株とともに系統樹解析を行った結果を図 2、3 に示した。5 月買上げのロシア産アカガイから検出された NVG2、E06-7-2 株は G2/13 M7 株と比較的近縁であった。このタイプが検出されたのは、当所では初めてのことであった。また、韓国産アカガイから検出された NVG1、E06-18-1 株は、景山らの分類に該当する近縁株はなく、西尾らの分類による C36 (AY641760 株) 類似であった。

HAV 陽性検体 E06-2-2 については、シーケンスの結果、1A に属した(図 4)。

2) 愛媛県のウイルス性胃腸炎集団発生事例と散発性胃腸炎患者からのウイルス検出

平成 18 年度に発生した急性胃腸炎の集団発生事例の内、11 事例について、当所でウイルス検索を行った。集団発生事例は、大部分が平成 18 年 10 月から 12 月に集中して発生した。疫学的調査により、4 事例が食中毒、4 事例が感染症及び 3 事例が有症苦情扱いと判断された。これ

らの事例からは全て NVG2 が検出された(表 3)。しかし、食中毒もしくは有症苦情全ての事例でカキ等二枚貝の関与は確認されなかった。食中毒もしくは有症苦情事例で検出された NV の一部について遺伝子解析を行ったところ、全ての株が、ヨーロッパ等で多く検出されている G2/4 Lordsdale タイプ変異株の、2006b 株類似であった。食中毒事例においては、従事者や施設のふき取りから検出されたウイルスと患者から検出されたウイルスが 100%一致する事例が多く、また、カキ関連食中毒例でよく見られる、複数の遺伝子型が検出された事例はなかったことから、ほとんどの事例で調理中の二次汚染が強く疑われた。

平成 18 年 10 月から 12 月までの間に散発性胃腸炎から検出された NV の一部と集団発生から検出された NV の一部について遺伝型解析を行った。期間中、検出された NV は全て G2 であり、4 つの遺伝子型が検出された。散発例については、シーズン始めの 10 月には G2/2 (SnowMountain) が多く検出され、その後 11 月初旬までに G2/3 (Mexico)、G2/6 (Miami) が散見されたが、11 月中旬以降は G2/4 (Lordsdale)のみ検出された。集団発生事例については全て G2/4 であった。

集団発生事例から検出された遺伝子型は G2/4 の 1 種類のみでしかも同時期の散発例から同じ遺伝型が検出されていることから、周辺地域における NV の流行が集団発生に関連していることが示唆された。

D. 考 察

わが国で消費される二枚貝の大部分は輸入品であると言われている。しかし、輸出国においてウイルス学的安全性の検査はほとんど行われていない。そこでわが国において、それらのウイルスの汚染状況についてサーベイランスを行い、国内における患者発生との関連をリアルタ

イムに監視する必要性が高まっている。

今回の調査では、過去の調査と比較して、輸入食品の NV 陽性率が低かった。中国産やロシア産アカガイから比較的多く検出されたが、陽性率が低かったため、国別の NV 汚染率を比較することは困難である。過去の調査と比較して陽性率が低かった原因は不明であるが、輸出国側での人の流行状況との関連を調査する必要もあると考えられた。また一方で、国内では、感染性胃腸炎の患者報告数が例年より約 1 ヶ月早く増加し始め、規模も過去最大になり、環境への NV の排出が多かったことが考えられたにもかかわらず、カキ由来の食中毒事例は全国的に見ても発生が見られなかった。これらの因果関係についても、今後検討していく必要があると思われた。また、輸入食品から検出された NV は、国内で流行している株とは相同性が非常に低い遺伝子型が検出されており、今後のそれらの流行状況は注意深く監視する必要があると考えられた。

HAV は中国産アカガイから 1 例検出されたのみであった。わが国の A 型肝炎のほとんどは、国内でカキやその他海産物等を介した、食中毒の様式をした糞口感染であるとされている。国内での HAV の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 ヶ月と長いいため、原因食材の究明は困難である。HAV による貝類汚染も NV と同じ経路と考えられ、HAV 陽性貝は同時に NV も陽性であったことから、貝類の NV 汚染モニタリングを高い精度で行えば、胃腸炎食中毒の予防だけでなく、A 型肝炎の予防にも有効に機能するものと考えられた。

輸入食品中の NV、HAV のウイルス量は微量である場合が多い。近年、高感度で定量精度の高い、リアルタイム PCR 法等のウイルス検出法が開発され、高い評価を得ている。しかし、今

回の調査では、陽性となった検体でも、リアルタイム PCR でコピー数が定量可能な 10 コピー以上を示したのは 1 例のみであり、その他の陽性例は 10 コピー以下であったか、Nested RT-PCR でのみ陽性であった。リアルタイム PCR は、食品中インヒビターの影響を受けやすいとも言われている。従って、高感度なウイルス検出には、食品からのウイルス粒子の精製、濃縮法や、ウイルス RNA 抽出法が大きく影響していると考えられる。また、混入している微量のインヒビターの影響を最小限にすることも必要である。最近、アミラーゼ処理による回収率の向上についての報告もあり、食品からのウイルスの精製・濃縮及びウイルス RNA 抽出法は今後もさらに検討していく必要があると考えられる。

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、環境中のウイルス量を安定且つ継続的にモニタリングする方法の開発が望まれる。

NV による胃腸炎の散発例と集団発生例の原因ウイルスを遺伝子解析すると、集団発生から検出された遺伝子型株と、ほぼ同時期に散発例から検出された株との塩基配列は極めて高いホモロジーを示し、地域社会で流行している遺伝子型株が、集団発生と密接に関連していることが示唆された。

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 及び Nested RT-PCR による NV 及び HAV 遺伝子の検出を行った。

平成 18 年 5 月から平成 19 年 2 月の間に 40 ロットの輸入魚介類を検査し、NV が 7 例 (17.5%)、HAV が 1 例 (2.5%) 検出された。NV は冬から春にかけてのみならず、年間を通じて散発的に検出された。

輸入魚介類から検出された NV の遺伝子型は、G2/13 M7 タイプと西尾らの分類による G1 C36 (AY641760 株) 類似タイプ等であった。

NV の流行形態は多様であり、長期間継続してのサーベイランスの必要性が強く感じられた。

散発例と集団発生例からの NV 遺伝型の分布は、両者とも相似しており、G2/4 Lordsdale タイプが大部分を占めた。

集団発生例と同時期の散発例からは高いホモロジーの遺伝子型株が検出され、集団発生と地域流行との密接な関連性が示唆された。

F. 健康危険情報

平成 18 年 5 月のアカガイから A 型肝炎ウイルス検出に際し、主任研究者 西尾治 (国立感染症研究所) を通じ、厚生労働省担当課に連絡した。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Mineyuki Okada, Yasutaka Yamashita, Mitsuaki Oseto, Tomoko Ogawa, Ikuo Kaiho, Kuniko Shinozaki : Genetic variability in sapovirus capsid protein. *Virus Gene* 33:157-161,2006.

2) Okada M, Tanaka T, Oseto M, Takeda N, Shinozaki K : Genetic analysis of noroviruses associated with fatalities in healthcare facilities. *Arch.Virol.* 151:1635-41. 2006

3) 市川高子、豊嶋千俊、近藤玲子、大瀬戸光明、井上博雄 : 無菌性髄膜炎を併発した手足口病の地域流行とエンテロウイルス分離状況—愛媛県。病原微生物検出情報、27 : 229-230、2006

2. 学会発表

1) 豊嶋千俊、近藤玲子、大瀬戸光明、井上博雄、山下育孝 : 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 年度全国公衆衛生獣医師協議会調査研究発表会、2006.8、東京都

表1 平成18年度月別・輸入国別の検査ロット数

国名	種類別	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	計
中国	アカガイ	2	1	1			1	1	4	4	3	17
	ハマグリ						1					1
韓国	アカガイ	2	1	1	4	4	1	3				16
	ハマグリ										1	1
	カキ						1					1
ロシア	アカガイ		2	2								4
	計	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	40

表2 平成18年度 輸入食品のウイルス陽性検体一覧

買上月	産地	種類	NV				HAV		
			Real time copies/1g		PCR	Sequence	Real time copies/1g 平均	PCR	Sequence
			G1 平均	G2 平均					
2006.5	中国	アカガイ	[72.8]	230.0	G2	NV G2(NT)	600.0	+	1A
2006.6	ロシア	アカガイ	0.0	0.0	G2	G2/13	0.0	-	-
2006.9	韓国	アカガイ	0.0	0.0	G1	C36[AY641760]類似	0.0	-	-
2006.11	韓国	アカガイ	0.0	0.0	G2	NV G2(NT)	0.0	-	-
2007.1	中国	アカガイ	0.0	0.0	G2	NV G2	0.0	-	-
2007.2	中国	アカガイ	0.0	0.0	G1、G2	NV G1、G2	0.0	-	-
			[42.1]	0.0	G1	NV G1	0.0	-	-
2007.2	中国	アカガイ	0.0	0.0	G1	NV G1	0.0	-	-
			[2.3]	0.0	G1	NV G1	0.0	-	-

※ []は、テストチューブ当たり (cDNA 4μl) のNVコピー数が10コピー以下

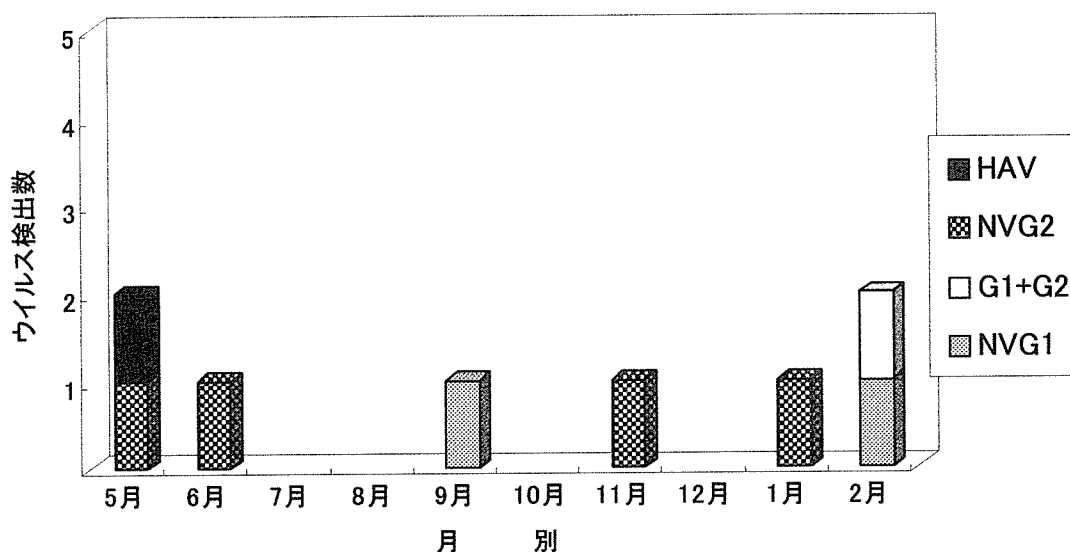


図1 平成18年度輸入食品からの月別ウイルス検出ロット数

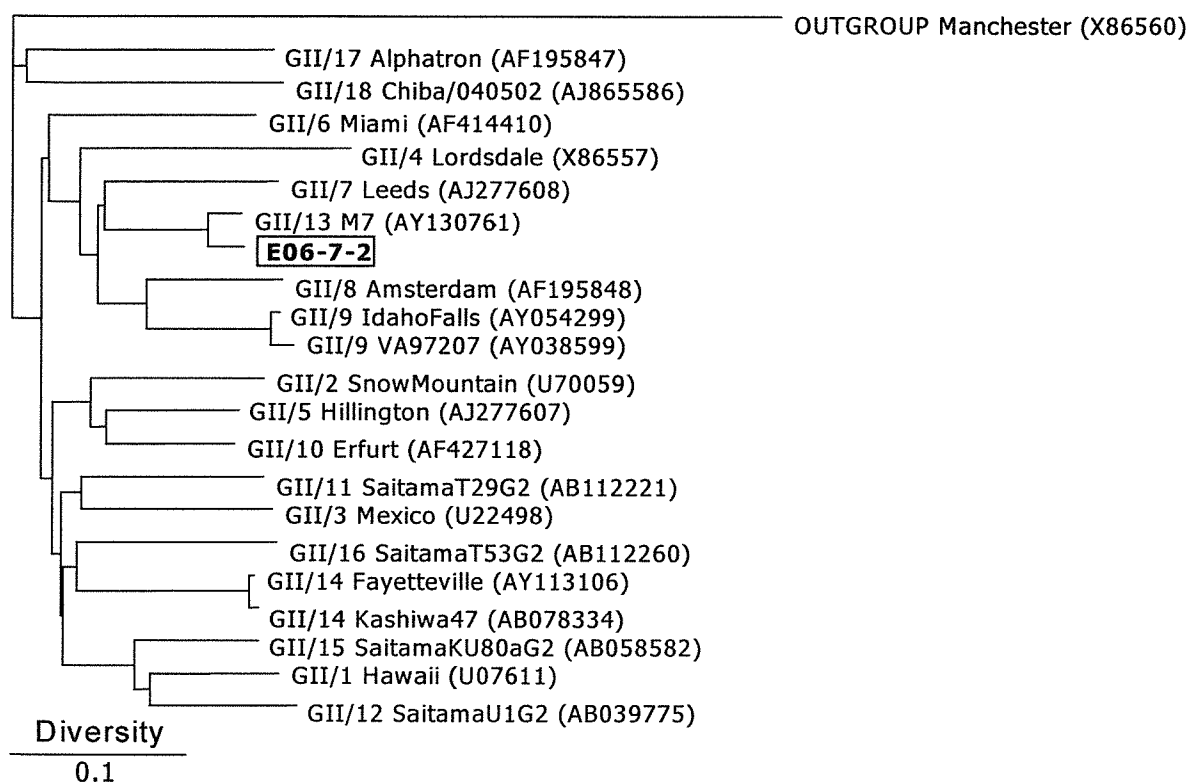


図2 輸入食品から検出されたNVのカプシド領域の系統樹解析結果 (GII)

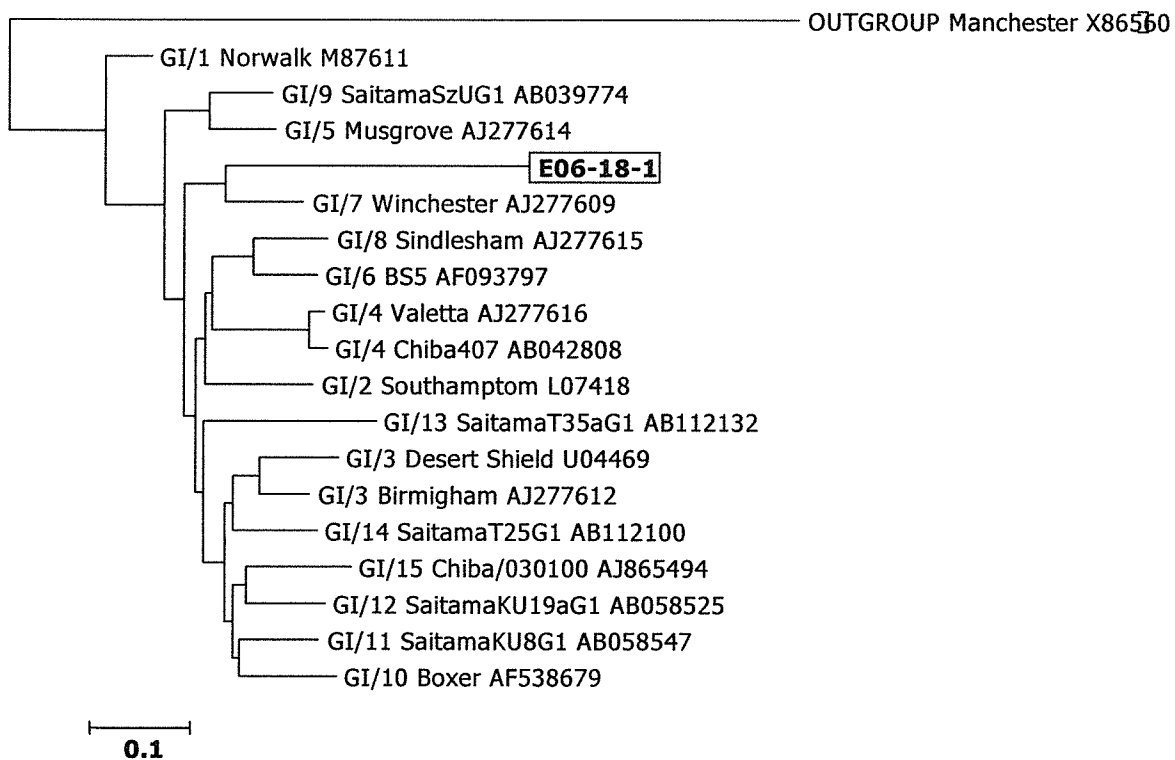


図3 輸入食品から検出されたNVのカプシド領域の系統樹解析結果 (GI)

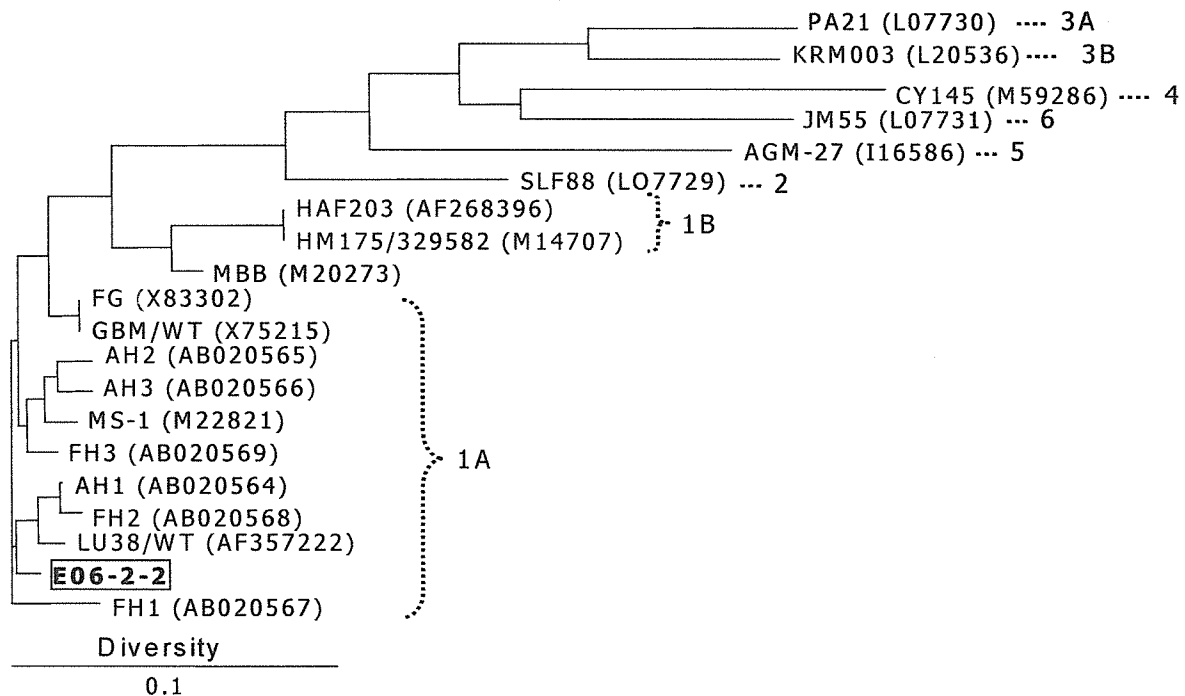


図4 輸入食品から検出されたHAVのVP1/2A領域の系統樹解析結果

表3 平成18年度に発生した集団発生事例からのNV検出状況

事例No	発生時期	発生施設	原因	発病者数/ 喫食者数	区分	検査 (人)数	NV 陽性数	NV 遺伝子型
1	2006年10月	飲食店	仕出料理	5 / 60	患者	6	6	G II / 4
					従事者	3	1	G II / 4
2	2006年11月	一般家庭(法事)	不明	15 / 41	患者	4	4	G II NT
					従事者			
3	2006年11月	集団給食施設	不明(給食)	24 / 32	患者	9	9	G II / 4
					従事者	2	1	G II / 4
					施設ふき取り	10	2	G II / 4
4	2006年11月	大学寮	不明 (給食・仕出料理)	18 / 130	患者	8	8	G II / 4
					従事者	12	0	
5	2006年12月	高齢者入所施設	感染症	33 /	患者	5	4	G II NT
6	2006年12月	大学寮	感染症	34 /	患者	2	2	G II NT
					従事者	1	0	
7	2006年12月	高齢者入所施設	感染症	23 /	患者	4	4	G II NT
8	2006年12月	ホテル	披露宴料理	73 / 127	患者	5	5	G II / 4
					従事者	22	0	
9	2006年12月	集団給食施設	給食	86 / 3840	患者	11	10	G II / 4
					従事者	25	14	G II / 4
					食品	12	3	G II / 4
					施設ふき取り	11	1	G II / 4
10	2006年12月	飲食店	仕出料理	63 / 148	患者	11	10	G II / 4
					従事者	6	3	G II / 4
11	2006年12月	高齢者入所施設	感染症	29 /	患者	4	3	G II NT

厚生労働科学研究費補助金（食品・安全確保推進研究事業）
輸入生鮮魚介類および動物生肉のウイルス汚染のサーベイランスに関する研究
分担研究報告書
分担研究項目 輸入食品のウイルス汚染状況に関する研究

主任研究所 西尾 治 国立感染症研究所
研究協力者 田中俊光 千葉県食品衛生検査所
菊池正悟 愛知医科大学公衆衛生学
木村博一、秋山美穂 国立感染症研究所

研究要旨

おもに中国、韓国から輸入された二枚貝などについて、ノロウイルス（NV）、A 型肝炎ウイルス（HAV）の汚染状況を調べた。検査を実施した 45 件のうち、15 件（33%）から NV が検出された。中国産アカガイの 14 件中 8 件（57%）、中国産ハマグリ 15 件中 5 件（33%）から NV が検出され、中国産二枚貝に汚染度が高い傾向が認められた。なお、HAV はすべて陰性であった。

A. 研究目的

NV による健康被害は、例年、冬期にピークを迎えるものの、近年では一年を通じて散発する傾向が見られる。また、NV による食中毒の原因食品としては、カキによるものが多く見られるが、最近ではカキに関連しない事例が多くなってきている。

このような状況の中で、季節に関係なく国内に大量に流通する輸入食品のうち、生鮮魚介類、特にアジアから輸入される二枚貝のウイルス汚染状況を調査し、安全性を評価するための基礎データの蓄積を目的とした。

B. 研究材料と方法

検査材料は、千葉市中央卸売市場に 2006 年 6 月～2007 年 2 月の間に搬入された、中国産アカガイ 14 件、ハマグリ 15 件、韓国産アカガイ 7 件、タイラギ 5 件、北朝鮮産ハマグリ 2 件、ロシア産アカガイ 1 件、マレーシア産ブラックタイガー（ウシエビ）1

件の計 45 件を用いた。

検査材料は 1 件につき 3 個（1 個は 1g 以上）を用い、各々検査を行った。

貝の中腸腺、またはエビの背腸を摘出した後、PBS で 10% になるようにホモジナイズし、10,000rpm で 20 分遠心後の上清を超速心法（35,000rpm で 3 時間）で濃縮して 200 μ l とした。この全量から High Pure Viral RNA Kit (Roche) を用いて RNA を抽出し、DNase I (TaKaRa) 処理後、Random Hexamer (Amersham) を用いて Super Script II (Invitrogen) で逆転写して cDNA を合成した。検査はこの cDNA をもとに NV、HAV ともリアルタイム PCR および Nested PCR を行った。NV のリアルタイム PCR のプライマーは G I では COG1F/COG1R、G II では COG2F/ALPF/COG2R を使い、プローブは Taq Man プローブ (ABI) で、G I は RING1-TP(a) と RING1-TP(b)、G II は RING2AL-TP を用いた。Nested PCR は、カブシド領域のプライマーを用いて行った。HAV

のリアルタイム PCR のプライマーは、HAV+499 と HAV-557 を用い、プローブは Taq Man プローブ (ABI) で、HAV+482-P-FAM を用いた。Nested PCR は、HAV+2799/-3273、および HAV+2907/-3162 プライマーを用いて実施した。

なお、リアルタイム PCR では実測値が 10 コピー以上のもの、もしくは Nested PCR では増幅された PCR 産物がダイレクトシーケンスで塩基配列が決定され、既存の NV もしくは HAV との相同性が認められたものを陽性とした。塩基配列が決定できたものに

ついては、標準株を用いて系統樹解析を行った。

C. 研究結果

輸入魚介類 45 件中から、NV が 15 件 (33%) 検出され、HAV はすべて陰性であった。

月別の NV および HAV の汚染状況を表 1 に示した。月毎の検査数が一定せず、また少なかったため、1 件が陽性になった場合の変動が大きい。7 月、2 月を除く月からは NV が検出された。(3~5 月は未実施。)

表1 輸入食品の月別NVおよびHAV汚染状況

月	検査数	NV		HAV	
		陽性数	陽性率	陽性数	陽性率
6	4	2	50%	0	0%
7	2	0	0%	0	0%
8	4	1	25%	0	0%
9	4	1	25%	0	0%
10	8	3	38%	0	0%
11	10	2	20%	0	0%
12	6	3	50%	0	0%
1	3	3	100%	0	0%
2	4	0	0%	0	0%
計	45	15	33%	0	0%

種類別の NV 汚染状況は、アカガイが 36%、ハマグリが 35%、ブラックタイガーが 100% から NV が検出された。(表 2)

表2 輸入食品の種類別NVおよびHAV汚染状況

種類	検査数	NV		HAV	
		陽性数	陽性率	陽性数	陽性率
アカガイ	22	8	36%	0	0%
ハマグリ	17	6	35%	0	0%
タイラギ	5	0	0%	0	0%
ブラックタイガー	1	1	100%	0	0%
計	45	15	33%	0	0%

国別の NV 汚染状況は、中国産が 45%で、アカガイの 57%、ハマグリが 33%が NV に汚染されていた。その他、検査数は少ないが北朝鮮産ハマグリが 2 件中 1 件で 50%、

マレーシア産ブラックタイガーが 1 件中 1 件で 100%であった。韓国産、ロシア産からは検出されなかった。(表 3)

表3 輸入食品の国別NVおよびHAV汚染状況

国	検査数	NV		HAV	
		陽性数	陽性率	陽性数	陽性率
中国	29	13	45%	0	0%
韓国	12	0	0%	0	0%
北朝鮮	2	1	50%	0	0%
ロシア	1	0	0%	0	0%
マレーシア	1	1	100%	0	0%
計	45	15	33%	0	0%

輸入魚介類から検出された NV 遺伝子型を表 4 に示した。GI が検出されたものは、すべて中国産アカガイで、今回使用した標準株と合致しない GI /不明が 4 件あった。その内訳は AY356543 類似株が 1 件、AY641760 類似株が 2 件、AY356546 類似

株が 1 件、AY356545 類似株が 1 件 (重複あり) であった。その他、GI /4、GI /5、GI /10 が 1 件ずつ検出された。GII では、GII /4 が 5 件と最も多く、その他 GII /1、GII /2、GII /5 が 1 件ずつ検出された。

表4 輸入食品から検出されたNVの遺伝子型

遺伝子群	遺伝子型	検出 件数	国	種類	検出 件数
GI	GI /4	1	中国	アカガイ	1
	GI /5	1	中国	アカガイ	1
	GI /10	1	中国	アカガイ	1
	GI /不明	4	中国	アカガイ	4
GII	GII /1	1	中国	ハマグリ	1
	GII /2	1	中国	アカガイ	1
	GII /4	5	中国	アカガイ	2
			中国	ハマグリ	3
	GII /5	1	北朝鮮	ハマグリ	1

輸入魚介類から検出された NV のウイルスコピー数を表 5 に示した。リアルタイム PCR で陽性になったものは全て GII で、検体 1g あたりのウイルスコピー数は 395~

2,105 コピーであった。なお、リアルタイム PCR および Nested PCR の両法で陽性になったものは 1 検体のみであった。

表5 輸入食品から検出されたNVのウイルスコピー数

採取月	種類	国	遺伝子群	copy/g
8	ブラックタイガー	マレーシア	G II	2,105
10	アカガイ	中国	G II	395
10	アカガイ	中国	G II	1,961
12	ハマグリ	中国	G II	635
1	ハマグリ	中国	G II	1,427

D. 考察

輸入魚介類のNV汚染は33%に認められ、例年より高い汚染率を示した。検体数が10件を超えて採取できたのは中国産と韓国産であったが、前年度（2005年4月～2006年1月）の調査に比べ、中国産の汚染率が上昇し、韓国産の汚染率が下降して、アジア地域での産地での差が認められた。検出された遺伝子型はG II/4 (Lordsdale/93/UK類似株) が最も多く、Lordsdale 類似株が本邦を含むアジア地域で広く行き渡っていることが示された。その一方、G I では前年度に引続き、本邦での検出が見られないAY356543 類似株などが検出され、これらの遺伝子型が中国などで継続していることを示唆した。また、輸入魚介類を通じて、海外からNVの新しい株が侵入することが示された。

E. 結論

2006年6月～2007年2月の間に千葉市中央卸売市場に搬入された輸入魚介類45件中15件(33%)からNVが検出された。HAVは検出されなかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Nishida T, Nishio O, Kato M, Chuma T, Kato H, Iwata H, Kimura H. Genotyping and

quantitation of noroviruses in oysters from two distinct sea areas in Japan. Microbiol Immunol in press.

西尾治. ノロウイルスの食中毒対策. 臨床と微生物 2006. 33:233-237.

野田衛, 西尾治, 山本美和子, 伊藤文明, 池田義文, 松本勝, 荻野武雄. カキからのノロウイルス検出におけるアミラーゼ処理の有用性. 広島市衛生研究所年報 2006. 25:35-43.

2. 学会発表

田中俊光. 中央卸売市場に流通する生食用カキのノロウイルス汚染状況について. 平成18年度日本獣医公衆衛生学会(関東地区), 川崎市. 2006.9.10.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（食品・安全確保推進研究事業）
輸入生鮮魚介類および動物生肉のウイルス汚染のサーベイランスに関する研究
分担研究報告書

分担研究項目 輸入生鮮魚介類および動物生肉のウイルス汚染調査

分担研究者：西田知子（山口県環境保健研究センター）

協力研究者：岡本玲子（山口県環境保健研究センター）

研究要旨

輸入生鮮食品の安全性を確保する目的で、2006年4月-2007年2月に市販されていた輸入二枚貝 53 検体のノロウイルス (NV)・A 型肝炎ウイルス (HAV) 汚染状況を調査するため、RT-PCR による遺伝子解析とリアルタイム PCR 法による定量を行った。また、2006年7月-2007年2月に市販されていた輸入豚肉 84 検体の E 型肝炎ウイルス (HEV) 汚染状況を RT-PCR により調査した。

輸入二枚貝 4/53 検体（約 7%）から NV 遺伝子が検出されたが、HAV 遺伝子は検出されなかった。リアルタイム PCR 法による定量では、NV GI、NVGII、HAV は、いずれも実測値が 10 コピー以下であり、濃厚汚染は起こっていなかったことが判明した。

輸入豚肉からは HEV 遺伝子を検出しなかったが、継続的にモニタリングすることが必要と考えられた。

A. 研究目的

近年、我が国では二枚貝で 9 万トン弱、豚肉で 34 万トンが輸入されており、輸入生鮮食品が食中毒ウイルスに汚染されていた場合、食品衛生上、大変大きなインパクトが与えられることが予想され、食の安全性の確保のためには、汚染状況調査は必須である。輸入生鮮食品が日本国内のウイルス性食中毒の発生と流行に、どのような影響を与えているかを明らかにする事が、ウイルス性食中毒の予防には、重要な課題と考えられる。そこで、市販輸入二枚貝のノロウイルス (NV)・A 型肝炎ウイルス (HAV) 汚染、市販輸入豚肉の E 型肝炎ウイルス (HEV) 汚染状況を調査した。

B. 研究方法

1) 市販輸入二枚貝

材料：2006年4月-2007年2月に市販されていた 53 検体（輸入国：中国 29、韓国 21、タイ 1、ベトナム 1）を用いた（表 1）。

方法：二枚貝の中腸腺を取り出し、1g を秤量し、10%乳剤とした後、10,000rpm で 20 分間冷却遠心し、上清を 30%スクロース液に重層して、40,000rpm、2 時間、超遠心処理を行った。その沈渣を 138 μ L の DDW に再浮遊し、2 μ L の Echo9 Hill 株 (10^2 粒子/mL) を加え、QIAamp viral RNA mini kit (QIAGEN) を用いて RNA を抽出した。抽出した RNA を DNase I (Takara) 処理し、DNase の不活化を行った後、ラ

ンダムヘキサマー (Promega) を用いて SuperScriptII (Invitrogen) により 1 時間の逆転写反応を行い、cDNA を作成した。作成した cDNA を用いて、COGF/R プライマーと TING-TPTaqMan プローブを用いた、影山らによる方法で、NV GenogroupI (NV GI)、NV GenogroupII (NV GII) の定量を行った。また、HAV+449/-557 プライマーと HAV+482TaqMan プローブを用いた、西尾らによる方法で、HAV の定量を行った。定量には ABI 社の PRISM7900 を用い、実測値 10 コピー (換算値 125 コピー/g) 以上のものを陽性とした。

さらに、遺伝子解析のため、作成した cDNA を用いて、NV GI については、キャプシド領域を増幅する COG1F/G1-SKR プライマーによる 1stPCR の後、G1-SKF/R プライマーを用いて 2ndPCR 反応を行い、NV GII については、同じくキャプシド領域を増幅する COG2F/G2-SKR プライマーによる 1stPCR の後、G2-SKF/R プライマーを用いて 2ndPCR 反応を行い、HAV については、HAV+2799/-3273 プライマーによる 1stPCR の後、HAV+2907/-3162 プライマーを用いて 2ndPCR 反応を行った。また、抽出と逆転写反応のコントロールとして添加した Echo9 Hill 株について、E9Hill-F/R プライマーを用いて PCR を行った。

増幅産物の有無は 1.5%アガロースゲル電気泳動により確認し、Echo9 Hill 株の増幅産物が確認され、さらに目的の大きさのバンドが確認されたものについて、MinElute PCR Purification kit (QIAGEN) を用いて精製し、Big Dye terminator vl.1 Cycle sequencing Kit (ABI) を用い

てシーケンス反応後、AutoSeq G-50 (GEヘルスケア) を用いて未反応代ターミネータを除去した。その後、ABI 社の PRISM310 を用いてシーケンスを行い、ClustalW により alignment を作成し、近隣接合法で片山らの方法に基づき分子系統樹を作成した。リファレンス株には GeneBank から GI/1~GI/15、GII/1~GII/18 を用い、アウトグループにはサポウイルスの Manchester 株を用いた。

表 1 調査材料 (輸入二枚貝)

	ハマ グリ	アサ リ	カキ	その 他
'06 年 4 月	2	3	1	2
5 月	2	1	2	-
6 月	2	3	1	1
7 月	2	3	1	-
8 月	1	-	-	1
9 月	1	1	2	1
10 月	2	1	1	-
11 月	3	1	1	1
12 月	2	2	1	-
'07 年 1 月	2	1	-	-
2 月	1	2	-	-

2) 市販輸入豚肉

材料：2006 年 7 月-2007 年 2 月に市販されていた 84 検体 (輸入国：メキシコ 13、カナダ 12、アメリカ 11、デンマーク 11、フランス 11、チリ 7、スペイン 6、ハンガリー 3、イタリア 2、ブラジル 2、中国 2、オーストラリア 1、オーストリア 1、オランダ 1、フィンランド 1) を用いた。

方法:肉片 25mg を細切し、RNeasy mini kit (QIAGEN)により RNA を抽出した。ランダムヘキサマー (Promega) を使い、SuperScriptII (Invitrogen) により 2 時間の逆転写反応を行い、抽出した RNA から cDNA を作成した。作成した cDNA を用いて遺伝子増幅を行った。1stPCR には HE7-1, 2/3, 4 プライマー (高橋ら)、HEV-F1/R2 プライマー (李ら) を使い、2ndPCR には HE7-5, 6, 7/8, 9 プライマー (高橋ら)、HEV-F2/R1 プライマー (李ら) を用いた。増幅産物の有無は 1.5%アガロースゲル電気泳動により確認した。

C. 研究結果

1) 市販輸入二枚貝

RT-PCR の結果、53 検体のうち、4 検体から NV 遺伝子が検出された。うち 1 検体からは 2 種類の株 (NV GI と NV GII の株) が検出された。NV GI/2、GI/4、GI/8 タイプの遺伝子が各 1 検体から、NV GII/2、GII/8 タイプの遺伝子が各 1 検体から検出された (図 1)。HAV 遺伝子は検出されなかった。

リアルタイム PCR 法による定量では、NV GI、NVGII、HAV は、全て実測値が 10 コピー (換算値 125 コピー/g) 以下であった。

2) 市販輸入豚肉

検査した 84 検体からはいずれのプライマーでも HEV 遺伝子を検出しなかった。

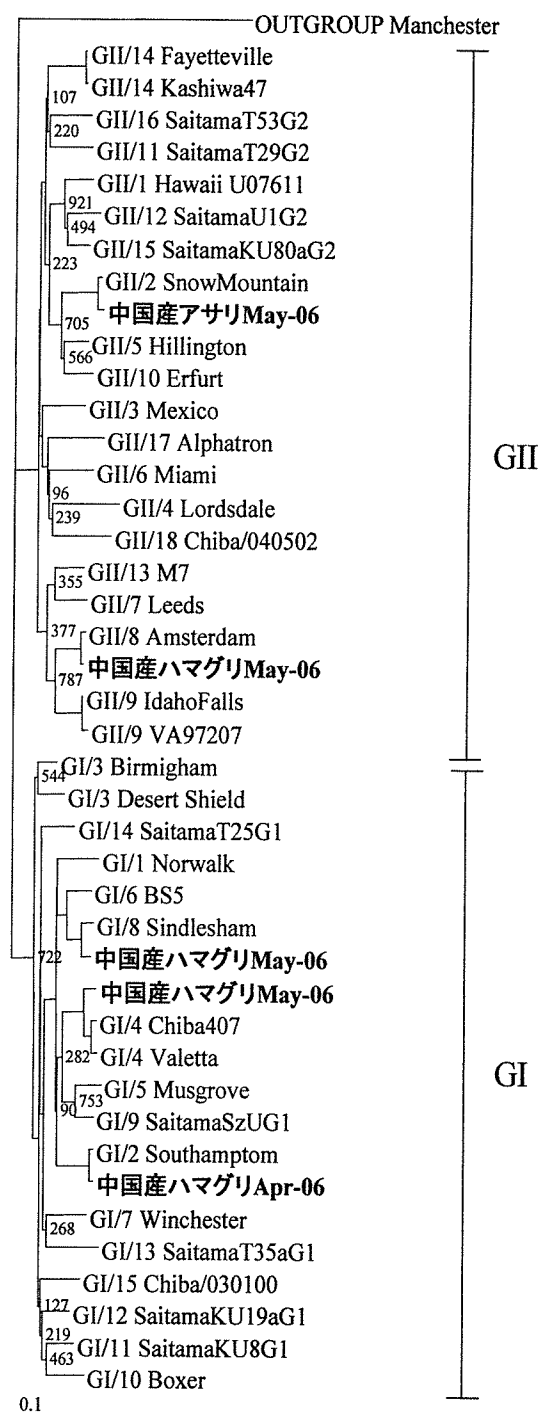


図 1 検出株の系統樹 (近隣接合法)

D. 考察

市販輸入二枚貝からの HAV 検出はなかったが、NV は 4/54 検体 (7.4%) から検出された。また、1 検体からは 2 種の株が検出され、二枚貝から複数のウイルス

株が検出されたという、杉枝らの報告と一致した。NV 遺伝子が検出された時期は、4 月と 5 月のみで、この時期に中国で二枚貝に NV 汚染が起こっていた事が判明した。また、検出された遺伝子タイプは多岐にわたっていた。しかし、汚染量は実測値が 10 コピー以下と低く、濃厚汚染は起こっていなかったことがわかった。

国内と国外での NV の流行疫学を解析するため、市販輸入二枚貝から検出した NV の遺伝子タイプについて、国内産の二枚貝または国内の食中毒や感染性胃腸炎由来株の遺伝子タイプと比較検討する必要があると考えられた。

HEV は疫学的に不明な点も依然多いため、輸入豚肉が感染原となっているケースが存在するのかどうかを明らかにする事が必要である。また、海外の HEV の浸淫状況調査のためにも、輸入豚肉の汚染を調査することは大変重要と考えられる。今回、市販輸入豚肉の HEV 汚染は見られなかったが、市販されているブタの月齢、採取した部位により、検出感度が異なる可能性が考えられるため、採取方法についても検討し、継続的にモニタリングすることが必要と考えられた。

E. まとめ

今回の調査では、市販輸入二枚貝の約 7%から NV 遺伝子を検出したが、定量結果からは濃厚汚染ではなかったことが分かった。また、市販輸入二枚貝の HAV 汚染、市販輸入豚肉の HEV 汚染は見いだせなかったが、引き続き調査を行う必要があると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

H. 研究発表

1) 論文発表

Nishida, T., Nishio, O., Kato, M., Chuma, T., Kato, H., Iwata, H., Kimura, H. Genotyping and quantitation of noroviruses in oysters from two distinct sea areas in Japan. *Microbiol. Immunol.* 51(2): 117-184, 2007

Hansman, G. S., Oka, T., Okamoto, R., Nishida, T., Toda, S., Noda, M., Sano, D., Ueki, Y., Imai, T., Omura, T., Nishio, O., Kimura, H., Takeda, N. Detection of human sapovirus in clams from Japan. *Emerg. Infect. Dis.* in press.

2) 学会発表

なし

厚生労働科学研究費補助金（食品・安全確保推進研究事業）

輸入生鮮魚介類および動物生肉のウイルス汚染のサーベイランスに関する研究

分担研究報告書

分担研究項目 輸入食品の汚染実態調査

分担研究者 古屋由美子 神奈川県衛生研究所

協力研究者 宮原香代子 神奈川県衛生研究所

片山 丘 神奈川県衛生研究所

田中 俊光 千葉市食品検査所

研究要旨

輸入生鮮魚介類42検体についてReal time PCRとRT-PCRによりノロウイルス (NV) およびA型肝炎ウイルス (HAV) の汚染実態を調べたところ、ウイルスに汚染された検体はなかった。今回の調査では輸入生鮮魚介類のウイルス汚染は示されなかった。

A. 研究目的

病原体汚染の危険性の高い輸入生鮮魚介類についてウイルス汚染実態を調べ、安全性を確保するためのデータを蓄積することを目的とした。

沈渣全てにリン酸緩衝液を加え200 μ lとし、10,000rpm20分遠心し上清140 μ lからQIAamp Viral RNA Mini Kit(Qiagen)を用いてRNAを抽出した。RNAはDNase 処理後、ランダムプライマーを用いたRT反応によりcDNAを作製した。Real time PCRによりNVおよびHAVのウイルスの定量を行うとともにRT-PCRによりNVおよびHAVの検出を行った。1検体につき3回検査を行い1回でも陽性であったものを陽性とした。

B. 研究方法

1) 輸入生鮮魚介類検査

平成18年5月は6検体、6月から平成19年2月まで毎月4検体ずつ合計42検体の中国、韓国、北朝鮮、ロシアからの二枚貝31検体およびフィリピン、タイ、インドネシアからのエビ類11検体について検査した。二枚貝は中腸線、エビ類は背腸を約1g、1検体につき3回取り出し、10%乳剤を作製し、超遠心でウイルス濃縮を行い、

C. 研究結果

1) 輸入生鮮魚介類検査

(1) 月別検出状況 (表1)

Real time PCRでは42検体すべて、NVG1、NVG2およびHAVは検出されなかった。RT-PCRで検

査した42検体中5検体でNVのプライマーによりDNAの増幅がみられたが、シーケンスの結果はNVとは確認されなかった。HAVはRT-PCRでも検出されなかった。

(2) 国別検出状況 (表2)

国別の検体では中国産17検体、韓国産9検体、北朝鮮産1検体、フィリピン産7検体、タイ産3検体、ロシア産4検体、インドネシア産1検体であったが、すべてからNVおよびHAVともに検出されなかった。

D. 考察

輸入生鮮魚介類は輸出国で検査が行われておらず、ウイルスによる汚染が懸念されている。しかし今年度はReal time PCR、RT-PCRの検査でNVおよびHAVは検出されず、ウイルスによる汚染は示されなかった。しかし二枚貝からのウイルスの抽出法を検討し、検出感度の向上につとめ、今後も輸入生鮮魚介類の安全性確保のためにさらに基礎データを蓄積する必要があると思われた。

また生鮮魚介類が原因の食中毒事例も発生していることから、情報の収集を行い、輸入食

品との関連を調べていく必要があると思われた。

E. まとめ

輸入生鮮魚介類についてウイルスによる汚染状況を調べたところ、NVおよびHAVによる汚染は示さなかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

H. 研究発表

1. 学会発表

宮原香代子、片山丘、古屋由美子：神奈川県で発生したヒトC群ロタウイルスによる集団胃腸炎事例：第80回日本感染症学会、東京、2006

2. 論文発表

宮原香代子、片山丘、古屋由美子：神奈川県におけるウイルス性集団胃腸炎の発生状況について（平成17年度）、神奈川県研報告 36:48-50 2006

表1. 輸入生鮮魚介類月別汚染状況

月	種類	検体数	陽性数	Real Time PCR☆		
				NV		HAV
				G1	G2	
5月	ハマグリ	2	0	0	0	0
	アカガイ	2	0	0	0	0
	タイラガイ	1	0	0	0	0
	ブラックタイガー	1	0	0	0	0
6月	ハマグリ	1	0	0	0	0
	アカガイ	1	0	0	0	0
	タイラガイ	1	0	0	0	0
	ブラックタイガー	1	0	0	0	0
7月	ハマグリ	1	0	0	0	0
	アカガイ	1	0	0	0	0
	アサリ	1	0	0	0	0
	ブラックタイガー	1	0	0	0	0
8月	アカガイ	3	0	0	0	0
	ブラックタイガー	1	0	0	0	0
9月	アカガイ	2	0	0	0	0
	ハマグリ	1	0	0	0	0
	ブラックタイガー	1	0	0	0	0
10月	アカガイ	2	0	0	0	0
	ハマグリ	1	0	0	0	0
	ブラックタイガー	1	0	0	0	0
11月	ハマグリ	1	0	0	0	0
	アカガイ	1	0	0	0	0
	ブラックタイガー	1	0	0	0	0
	タイラガイ	1	0	0	0	0
12月	ハマグリ	1	0	0	0	0
	アカガイ	1	0	0	0	0
	タイラガイ	1	0	0	0	0
	ブラックタイガー	1	0	0	0	0
1月	ハマグリ	1	0	0	0	0
	アカガイ	1	0	0	0	0
	タイラガイ	1	0	0	0	0
	ブラックタイガー	1	0	0	0	0
2月	ハマグリ	1	0	0	0	0
	アカガイ	1	0	0	0	0
	ブラックタイガー	2	0	0	0	0
合計		42	0			

☆ 中腸線1gあたりのコピー数を示す

表2. 輸入生鮮魚介類国別汚染状況

原産国	種類	検体数	陽性数	Real Time PCR☆		
				NV		HAV
				G1	G2	
中国	ハマグリ	10	0	0	0	0
	アカガイ	7	0	0	0	0
韓国	アカガイ	3	0	0	0	0
	タイラガイ	5	0	0	0	0
	アサリ	1	0	0	0	0
北朝鮮	アカガイ	1	0	0	0	0
フィリピン	ブラックタイガー	7	0	0	0	0
タイ	ブラックタイガー	3	0	0	0	0
ロシア	アカガイ	4	0	0	0	0
インドネシア	ブラックタイガー	1	0	0	0	0
合計		42	0			

☆ 中腸線1gあたりのコピー数を示す

厚生労働科学研究費補助金（食品・安全確保推進研究事業）
輸入生鮮魚介類および動物生肉のウイルス汚染のサーベイランスに関する研究
分担研究報告書

分担研究項目 輸入生鮮魚介類のウイルス汚染に関する研究

分担研究者：杉枝正明（静岡県環境衛生科学研究所）

協力研究者：足立 聡（静岡県環境衛生科学研究所）

森下高行（愛知県食品衛生検査所）

研究要旨

輸入生鮮魚介類のウイルス汚染をサーベイランスするため、平成 18 年 5 月～翌年 2 月の期間に、愛知県食品衛生検査所で採取した輸入魚介類について調査した。国別では中国、韓国、ロシアおよび台湾の生息地で生産されたアカガイ、ハマグリ、カキおよびトコブシの 4 種類 40 件であった。これらの貝類から Norovirus (NV)、Hepatitis A virus(HAV)および Hepatitis E virus(HEV)のウイルス汚染について、リアルタイム PCR 法および RT-PCR 法を用いて調査した。

その結果、40 件 120 検体から NV、HAV および HEV はリアルタイム PCR 法および RT-PCR 法では検出されなかった。しかし、食品の安全性を確保するためには継続した調査が必要とおもわれる。

A 目的

食品の安全性を確保するため、諸外国から輸入されている生鮮魚介類のウイルス汚染状況を調査した。

B 方法

調査対象：2006 年 5 月～翌年 2 月の期間に、愛知県に輸入された生鮮魚介類を毎月 4 件採取し、検査対象とした。

国別、種類別の輸入状況では、アカガイが中国、韓国、ロシアから 32 件、ハマグリが中国から 6 件、韓国からカキが 1 件、トコブシが台湾から 1 件の計 40 件であった（表 1）。

検査方法：各検査材料の中腸腺(1 g 以下のものについては数個)を切り出して、PBS(-)で 10%乳剤を作成し、10,000rpm、20 分間冷却遠心後、その上清を 30%ショ糖溶液に重曹して 40,000rpm、120 分超超遠心し、沈渣に蒸留水 140 μ l を加えたものを試料を試料とした。

RNA の抽出：RNA 抽出は QIAamp Viral RNA Mini Kit(Qiagen)を用い、その使用については添付マニュアルに従って実施した。そして、DNase 処理は、上記の試料を DNase I で処理し、37°C に 30 分、次いで 75°C に 5 分置いた後、直ちに 4°C にした。