

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

－ベトナムの小児急性下痢症患者におけるノロウイルスの疫学的研究－

分担研究者 鈴木 宏

新潟大学大学院医歯学総合研究科  
国際感染医学講座公衆衛生学分野

共同研究者 西川眞、田村務

新潟県保健環境科学研究所ウイルス科

研究要旨

海外からの海産物が大量に輸入され、特にウイルスに汚染された食品からの下痢症発生は危惧される。本年はベトナムの中部で海外沿いにあるニャチャン市において、2005年12月から2006年6月までの約半年で小児急性下痢症患者糞便を用い、ノロウイルスの疫学的研究を行った。

全患者183人の患者の中、ウイルスは85人（46%）から検出され、ロタウイルス、ノロウイルス、アデノウイルスはそれぞれ73例、13例、3例であった。ロタウイルスは調査期間中見られ、血清型ではG1, 2, 3, 4型が見られたが、G3型が最も多く、次いでG1型であり、M型の流行曲線の最初の1月にピークはG1型、次の3月のピークはG3型の流行によって形成された。このM型の流行曲線の谷の部分にノロウイルス、最後にアデノウイルスと交互の流行が見られ、将来のロタウイルスワクチンの評価での留意点になるものと思われた。

ノロウイルス遺伝子型はGIIのみが検出され、中でもGII-4が優位であり、GII-12、GII-6が続いた。GII-4全てが増幅部位中の塩基配列324nt部位の比較では全て一致し、ニャチャンでの流行は同一株での流行が強く示唆された。GII-4株はGII-4eに属した。今回と同時期にベトナムのハイフォン市からの検体からもGII-4株が検出されたが、GII-4bに属し、同じ国でも異なった遺伝子株が流行していることが示唆された。また、GII-4株は、2005年から2007年にかけて新潟で検出した株とは異なるクラスターではあるが、2005-2006年に検出した株に近く、近隣諸国での流行を調査することの必要性が示された。

以上、ノロウイルス感染症がベトナム海岸部でも見られ、これまでの日本での調査から、糞便の処理の問題かと海産物への汚染が高頻度に発生している可能性があり、ベトナム産海産物の注意深い今後の検索の必要性が示唆された。

## A. 研究目的

海外からの海産物が大量に輸入され、特にウイルスに汚染された食品からの下痢症発生は危惧される。一方、熱帯、亜熱帯における小児急性胃腸炎患者の病因ウイルスの挙動調査はまだ不十分である。更には、これらの国においてロタウイルスへのワクチン投与が検討され、その効果判定にも大きな影響が懸念される。本研究においては、ベトナムの中部に位置するニャチャン市（図1）における小児急性胃腸炎患者のノロウイルスの疫学的研究に加え、他の病因ウイルスも併せて分子疫学的手法も加えた疫学的解析を行った。

## B. 研究方法

### 1. 材料

ベトナムのニャチャン市内の病院に受診した、183人の乳幼児の糞便を調査対象とした。採取期間は、2005年12月23日から2006年6月6日までの期間で、患者の年齢幅は1ヶ月齢から47ヶ月齢であった。

### 2. 方法

主要な胃腸炎起因ウイルスと考えられる、ロタウイルス、ノロウイルス、アデノウイルスについて検索した。収集した患者便から、ウイルス遺伝子の検出を行った。

便は、PBS(-) pH7.2により、約10%濃度に溶解し、9000rpm 20分遠心した上清をDNA/RNA抽出用サンプルとした。DNA/RNAの抽出には、Extragen II (TOSOH)を使用した。

ノロウイルスは、Yanら2)の方法を若干変更し、ノロウイルスだけのマルチプレックスRT-PCRとし、G I用プライマーにG1SKF/G1SKR

を、G II用プライマーにCOG2F/G2SKRを用いて検索した。遺伝子型の決定と分子疫学的解析には、RT-PCR増幅産物のダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定し、Mega3.1を用い解析した。

ロタウイルスは、Gouveaら1)の方法に準じてRT-PCRを行った。1stPCRで陽性となった検体は、G血清型別用プライマーセットを用いて、Nested PCR法で型別した。

アデノウイルスは、型共通プライマーHex1885/Hex1913を用いてPCR法で検索した。

## C. 考察・結果

全患者183人の月別の胃腸炎患者便の収集数は、12月から3月にかけて増加し、その後減少し（図2）、患者月齢は、7ヶ月齢から18ヶ月齢が最も多く、全体の64%を占めた。これらの患者の中からウイルスは85人（46%）から検出され、ロタウイルスは73例、ノロウイルスは13例、アデノウイルスは3例であり（表1）、この期間の胃腸炎の約半数が、ウイルス性の胃腸炎であった。また、ウイルスが検出された内の2名はロタウイルスとノロウイルスの混合感染、2名はロタウイルスの2つの血清型の混合感染で見られ、ウイルスの総検出株数は87件であった。

### 1) ロタウイルス：

最も多く検出されたのはロタウイルスで、調査期間の12月から6月まで全期間を通じて検出され、3月にピークを持ち、1月がそれに次ぎ、全体ではM型を呈した（表1、図3）。月例別の検出頻度では、2歳以下が

大部分で (85.9%) あり、13-18 ヶ月がピークであり (図 4)、これまでの諸外国での報告と一致していた。

ウイルスの型別では、G3 型が最も多く 35 株で、次いで G1 型が 28 株で、両者でロタウイルス検出件数の 86% (63 株/73 株) を占めた。このほかの血清型では、G2 型 7 株、G4 型 1 株、型別不能 2 株であった。検出時期をみると、G1 型は全期間を通じて検出されたが 1 月に最も多く、G3 型は 2 月以降に検出され、3 月に最も多かった。このことから、先に述べ M 型の流行曲線の最初のピークは G1 型、次のピークは G3 型の流行によって形成されることが明らかになった (図 3)。なお、近年、G9 型ロタウイルスが増加傾向にあるとの報告があるが、今回の調査では検出されなかった。

ベトナムではロタウイルスの迅速診断を用いていたが、我々が今回用いた PCR による調査結果と異なり、当地で用いられた方法の感度は 98.3% と高かったが、特異度は 41.5% と極めて低く、今後のサーベイランス法の見直しが望まれた。

## 2) ノロウイルス :

ロタウイルスの次に多かったのはノロウイルスであり、13 人 (15%) の患者から検出された (表 1)。ウイルスの検出時期は、12 月から 4 月までの間であり、月例別の検出頻度では、2 歳以下が大部分であり、7-12 ヶ月がピークであった (図 4)。

全てが GII に属し、GI は検出されなかった (図 3)。GII 型のノロウイルスのうち、遺伝子型が決定できたのは 8 株で、GII-4 が 4 株、GII-12

が 3 株 (うち 1 株はロタウイルスと混合感染)、GII-6 が 1 株であった (図 5)。検出された GII-4 の 4 株は、増幅部位中の塩基配列 324nt 部位の比較では全て一致し、ニャチャンでの流行は同一株での流行が強く示唆された。

GII-4 株の BLAST 検索において、Norovirus Hu/Chiba/04-974/2004/JP (AB220925) に最も近縁であり、分子系統樹による解析では、Okada らの分類によると GII-4e に属した。Hansman らが 1999 年から 2000 年にかけて、ホーチミン市の胃腸炎の子供からウイルスを検出を試み、5.4% の胃腸炎患者からノロウイルスを検出し、GII-4 が最も多く、今回の調査結果とほぼ同じ結果であった。しかし、遺伝子解析では、GII-4 株であっても Hansman らが検出した株、今回検出した株、更には 2005 年から 2007 年にかけて新潟で検出した株とは異なるクラスターを形成し、GII-4 ジェノタイプは、各国で流行の主体であるが、それぞれでは異なる遺伝子株が流行していると考えられた (図 5)。また、今回と同時期にベトナムのハイフォン市からの検体からも GII-4 株が検出されたが、GII-4b に属し、同じ国でも異なった遺伝子株が流行していることが示唆された (図 6)。

今回検出した GII-4 株は、2005 年から 2007 年にかけて新潟で検出した株とは異なるクラスターを形成ではあるが、2005-2006 年に検出した株に近かった。

3) アデノウイルス : アデノウイルスが検出されたのは、3 名 3 株のみ

で、4月、5月に受診した患者から検出された（表1、図3）。アデノウイルスは、4月、5月のみの時期に検出され、ロタウイルスやノロウイルスとは流行の時期が異なっていた。月例別の検出頻度では、2歳以下が大部分であった（図4）。

なお、ベトナム北部ハイホン市でも検索を4月以降開始し、アデノウイルスの流行がニャチャンとほぼ同時期に見られた。

#### D. 結論

熱帯に属するベトナムのニャチャンにおいて12月から6月の半年間、小児急性下痢症患者糞便の約半数からウイルスが検出された。ロタウイルスは期間中見られ、流行曲線の最初のピーク

はG1型、次のピークはG3型の流行であることが示された。ノロウイルスは12月から4月までの間で見られ、全てがGIIに属し、GII-4が優位で、GII-12、GII-6が検出された。本ウイルスの性状と海岸部の調査であることを踏まえ、今後のベトナム産海産物の注意深い検索の必要性が示唆された。

#### E. 健康被害情報

無し。

#### F. 知的財産権の出願・登録状況

無し。

#### G. 研究発表（原著論文，所報等も含む）

無し。

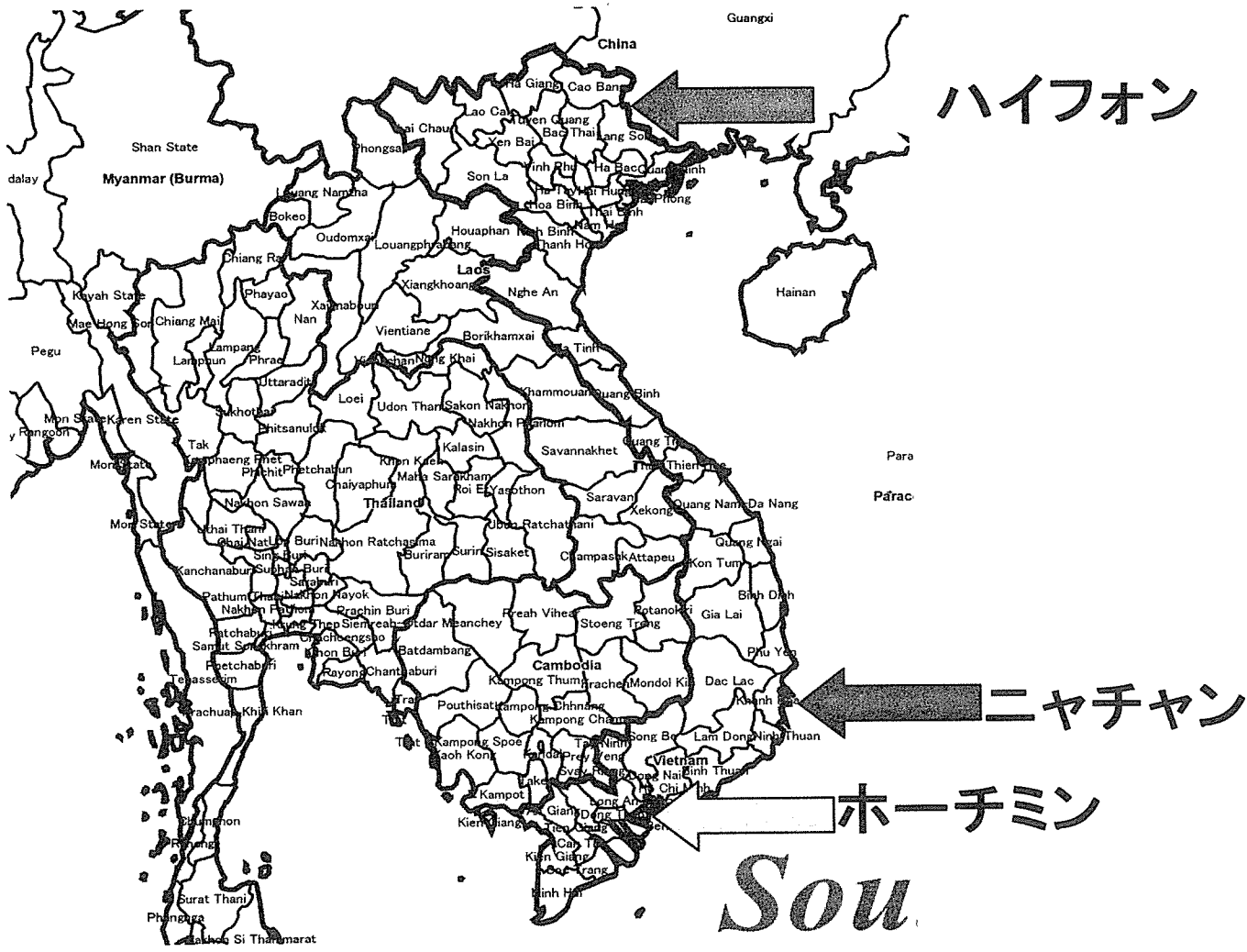


図 1 . ベトナムにおけるウイルス性下痢症の疫学的研究

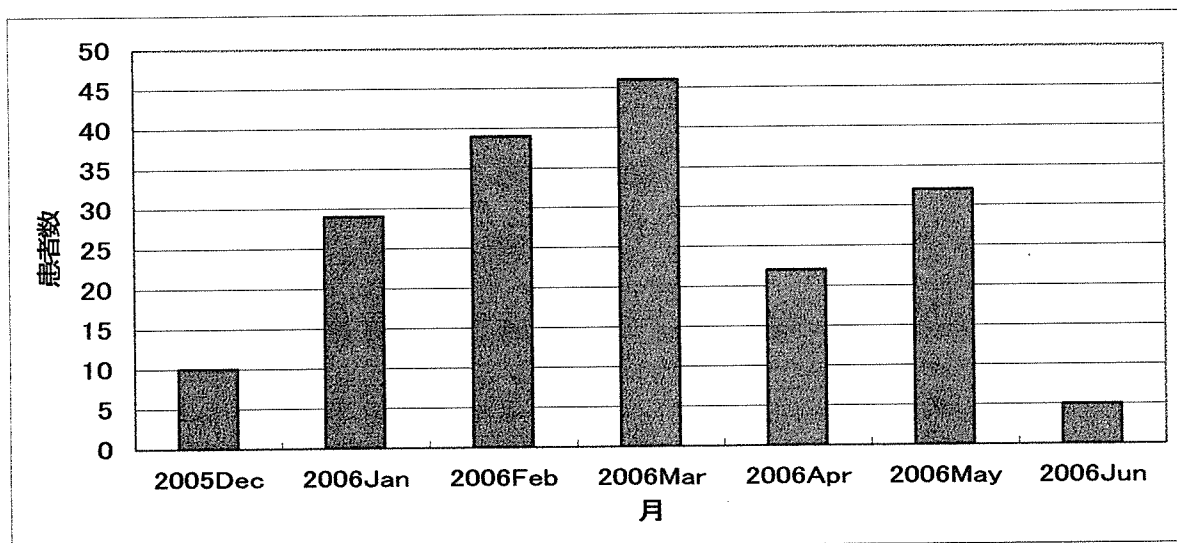


図 2 . 急性下痢症患者糞便の月別検査数

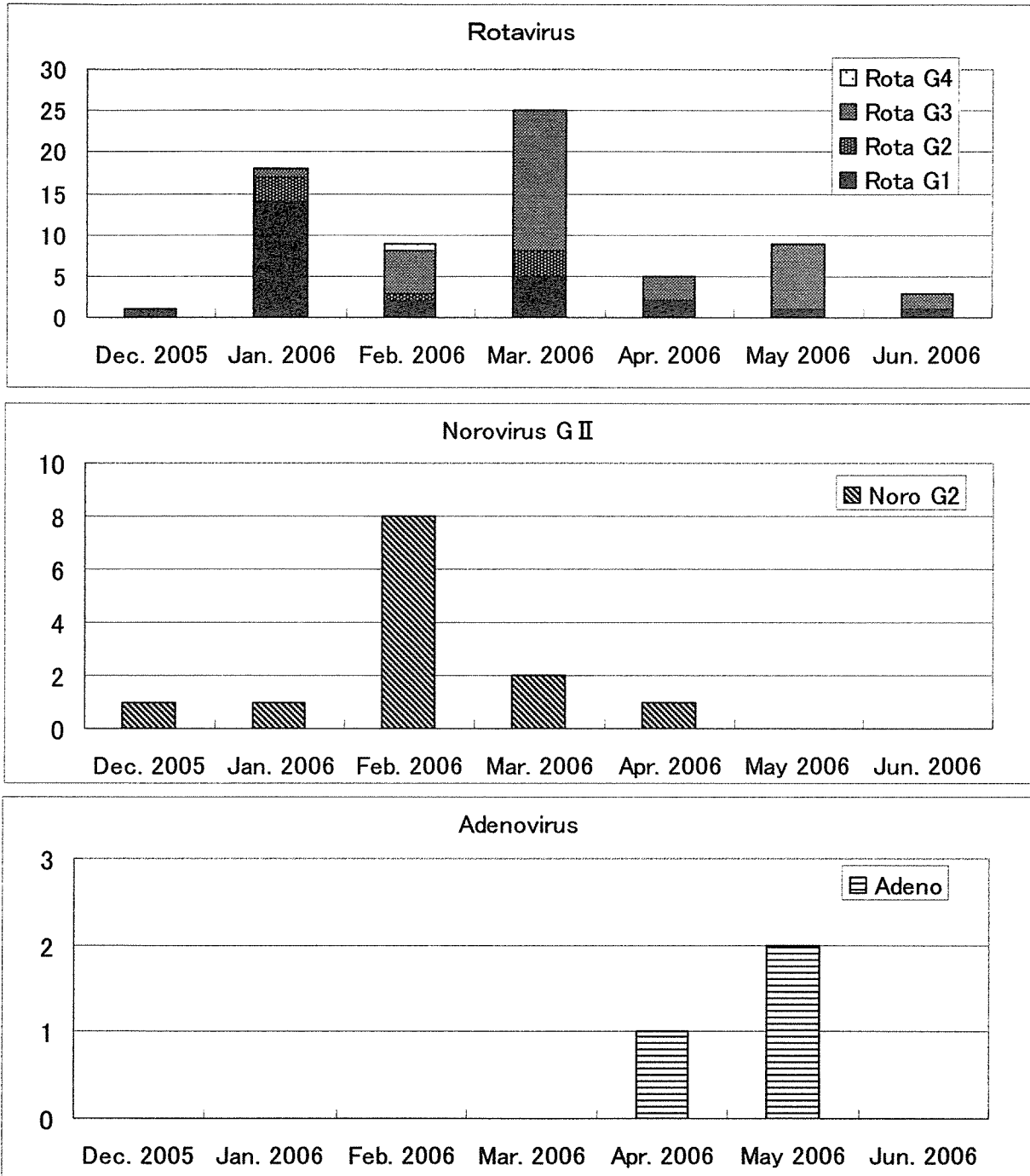


図 3 . ロタウイルス、ノロウイルス、アデノウイルスの月別検出頻度

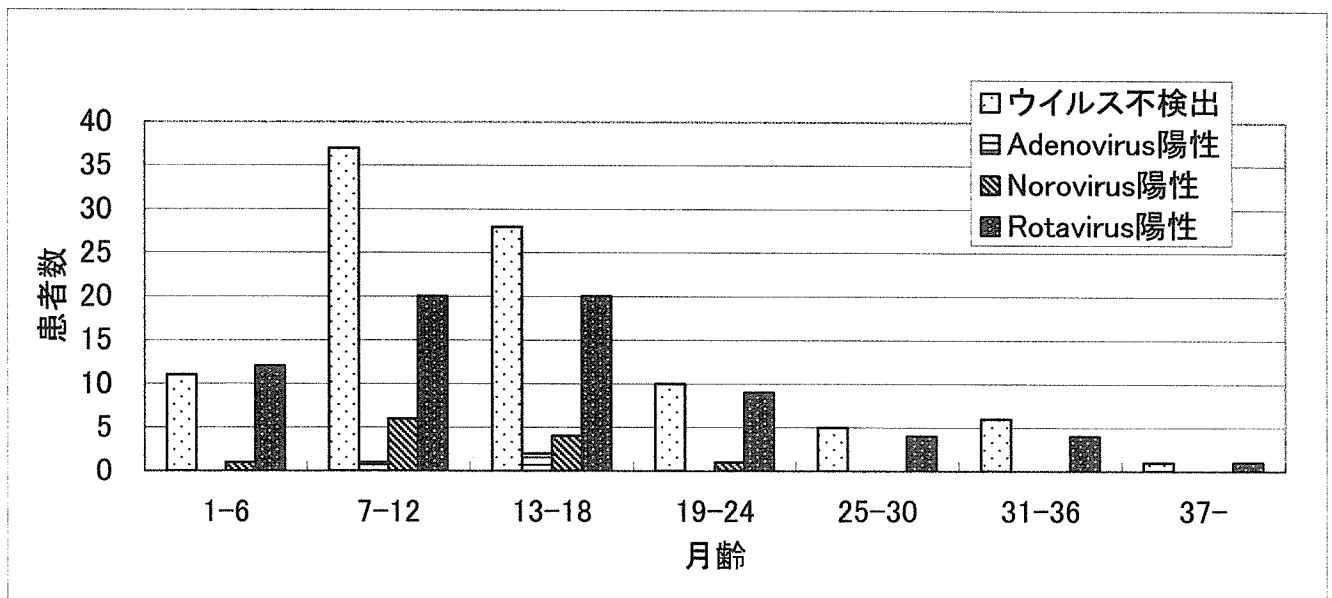
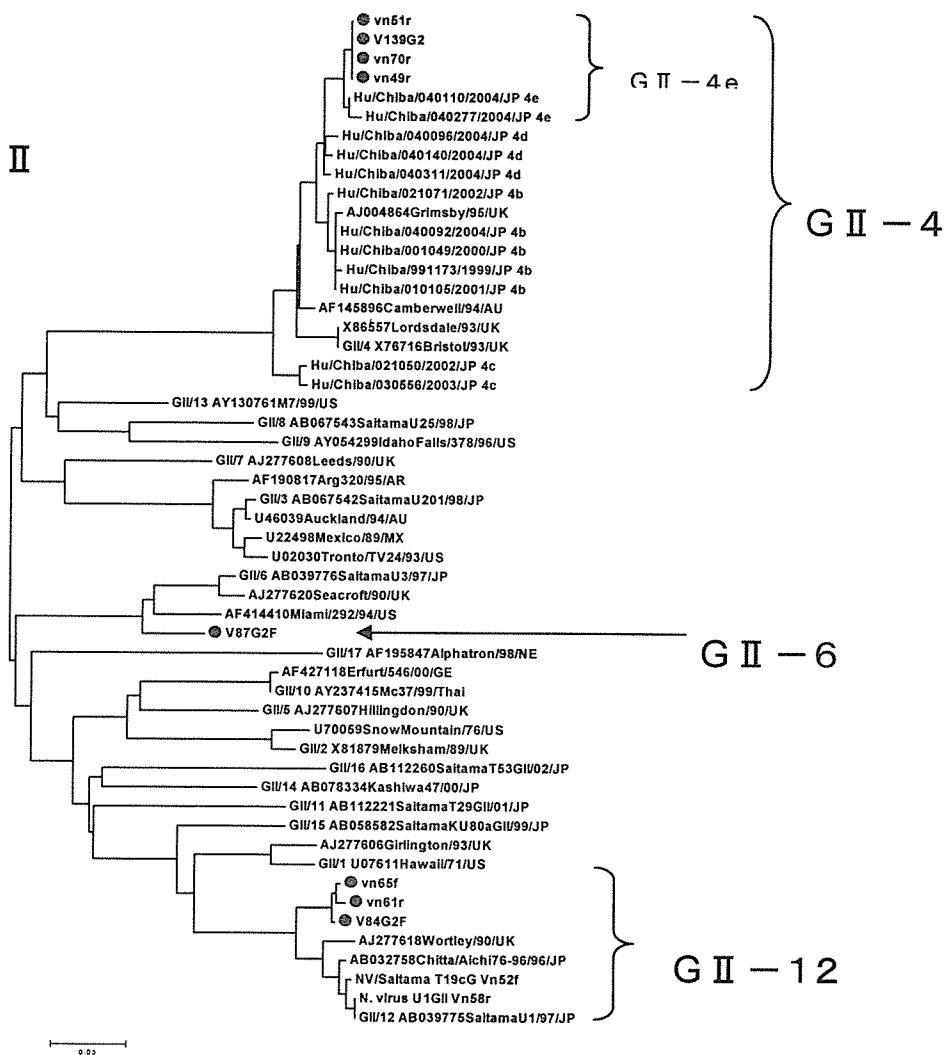


図4. 月齢階層別ウイルス検出状況

Noro G II



G II -4の細かい参照株を入れた。

図5. ノロウイルス GII 系統樹解析



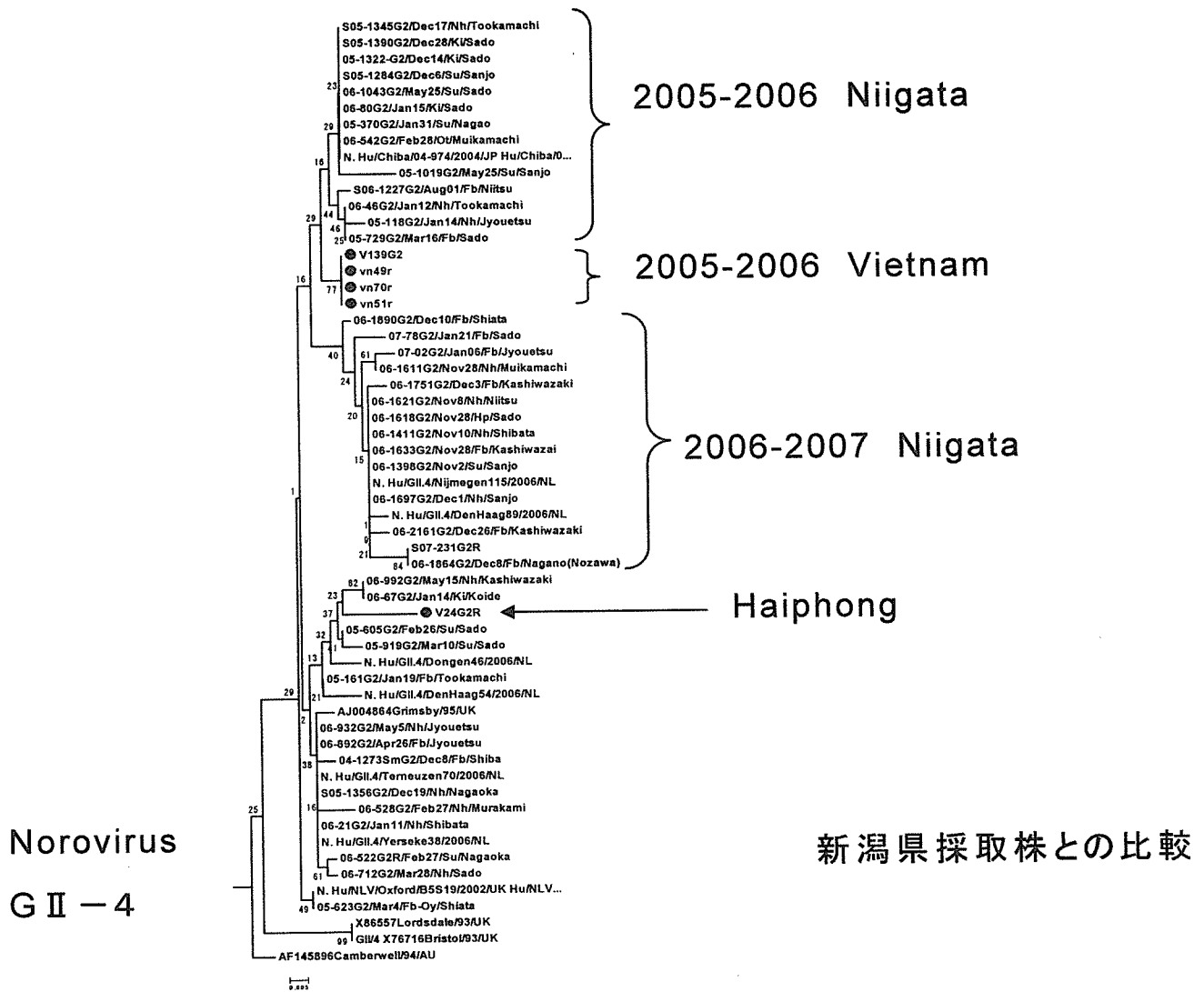


図 6. ベトナムと新潟から検出したノロウイルス GII-4 の系統樹解析

表 1. 小児急性胃腸炎患者糞便からの月別ウイルス検出率

	2005 年			2006 年			合計
	12 月	1 月	2 月	3 月	4 月	5 月	
ロタウイルス	3	18	9	25	6	9	73
ノロウイルス	1	1	8	2	1	0	13
アデノウイルス	0	0	0	0	1	2	3
							89

### Ⅲ

## 研究成果の刊行物・別刷

## 研究成果の刊行に関する一覧表

1. 西尾治. ノロウイルスの食中毒対策. 臨床と微生物 33:233-237, 2006.
2. 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 25:35-43, 2006.
3. 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)、神奈川衛研報告 36:48-50 2006.
4. 柳生文宏, 砂田亜津子, 小島禎, 池戸正成, 沖津祥子, 牛島廣治. 新しい遺伝子増幅技術によるノロウイルスの検出法補の比較. 感染症学雑誌 80 : 275-276, 2006.
5. 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.
6. Okada M, Tanaka T, Oseto M, Takeda N, Shinozaki K. Genetic analysis of noroviruses associated with fatalities in healthcare facilities. Arch Virol. 151:1635-1641. 2006.
7. Okada M, Yamashita Y, Oseto M, Ogawa T, Kaiho I, Shinozaki K. Genetic variability in sapovirus capsid protein. Virus Gene 33:157-161, 2006.
8. Phan TG, Trinh OD, Yagyu F, Sugita K, Okitsu S, Muller WEG, Ushijima H. Outbreak of sapovirus infection among infants and children with acute gastroenteritis in Osaka City, Japan during during 2004-2005. J Med Virol. 78(6):839-846, 2006.
9. Phan TG, Kuroiwa T, Kaneshi K, Ueda Y, Nakaya S, Nishimura S, Yamamoto A, Sugita K, Nishimura T, Yagyu F, Okitsu S, Müller WEG, Maneekarn N, Ushijima H. Changing Distribution of Norovirus Genotypes and Genetic Characterization of Recombinant GIIB among Infants and Children with Diarrhea in Japan. J Med Virol. 78(7): 971-978, 2006.

10. Khamrin P, Maneekern N, Peerakome S, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Molecular characterization of a rare G3P[3] human rotavirus reassortant strain reveals an evidence for human-animals multiple interspecies transmissions. *J Med Virol.* 78(7):986-994, 2006.
11. Okame M, Akihara S, Hansman G, hainan Y, Thien Tuan Tran H, Phan TG, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Existence of multiple genotypes associated with acute gastroenteritis during 6-year survey of norovirus infection in Japan. *J Med Virol.* 78(10):1318-1324, 2006.
12. Phan TG, Yagyu F, Kozlov V, Kozlov A, Okitsu S, Müller WEG, Ushijima H. Viral gastroenteritis and Genetic Characterization of Recombinant Norovirus among Infants and Children with Diarrhea in Eastern Russia. *Clin Lab.* 52(5-6): 247-253, 2006.
13. Phan TG, Yan H, Khamrin P, Quang T, Dey SK, Yagyu F, Okitsu S, Mueller WEG, Ushijima H. Novel intragenotype recombination in sapovirus. *Clin Lab* 52(7-8):363-366, 2006.
14. Phan TG, Takanashi S, Kaneshi K, Ueda Y, Nakaya S, Nishimura S, Sugita K, Nishimura T, Yamamoto A, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Detection and genetic characterization of norovirus strains circulating among infants and children with acute gastroenteritis in Japan during 2004-2005. *Clin Lab.* 52 (9-10): 519-525, 2006.
15. Phan TG, Trinh QD, Kaneshi K, Ueda Y, Nakaya S, Nishimura S, Sugita K, Nishimura T, Yamamoto A, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Emergence of new variant rotavirus G3 among infants and children with acute gastroenteritis in Japan during 2003-2004. *Clin Lab,* 53: 41-48, 2007.
16. Phan TG, Yan H, Li Y, Okitsu S, Müller WEG, Ushijima H. Novel Recombinant Norovirus in China. *Emerg Infect Dis.* 12(5): 857-858, 2006.

17. Phan TG, Okitsu S, Müller WEG, Kohno H, Ushijima H. Identification of Novel Recombinant Sapovirus in Japan. *Emerg Infect Dis.* 12(5): 865-867, 2006.
18. Okitsu-Negishi S, Okame M, Shimizu Y, Phan TG, Tomaru T, Kamijo S, Sato T, Yagyu F, Mueller WEG, Ushijima H. Detection of norovirus antigens from recombinant virus-like particles and stool samples by a commercial norovirus enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 44:3784-3786, 2006.
19. Maneekarn N, Khamrin P, Chan-it W, Peerakome S, Sukchai S, Pringprao K, Ushijima H. Detection of rare G3P[19] porcine rotavirus strains in Chiang Mai, Thailand provides evidence for the origin of VP4 genes of Mc323 and Mc345 human rotaviruses. *J Clin Microbiol* 44:4113-4119, 2006.
20. Phan TG, Khamrin P, Quang TD, Dey SK, Yagyu F, Okitsu S, Nishio O, Ushijima H. Genetic characterization of group A rotavirus strains circulating among children with acute gastroenteritis in Japan in 2004-2005. *Infection, Genetics and Evolution.* 7:247-253, 2007.
21. Phan TG, Trinh QD, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Emergence of rare sapovirus genotype among infants and children with acute gastroenteritis in Japan. *Eur J Clin Microbiol & Infect Diseases.* 26(1):21-27, 2007.

# ノロウイルスの食中毒対策

NISHIO OSAMU

西尾 治

◎国立感染症研究所感染症情報センター

## はじめに

ノロウイルスによる急性胃腸炎が、高齢者特別養護施設で2004年末から2005年の初めにかけて全国的に集団発生し、亡くなられた人もみられた。このことからノロウイルスによる集団発生が社会的にも大問題となり、ノロウイルスは広く知られることとなった。

ノロウイルスは一般的に聞きなれないウイルス名で、殺人ウイルスであるがごとき誤解も生じ、社会的に大きな不安をもたらした。実際には、このウイルスは古くからあるウイルスで、決して殺人ウイルスでもない。

また、2004年に厚生労働省に届けられた食中毒の原因物質別事件数は全体の第2位であり、患者数は45%を占め、今や食中毒患者の半数を占める勢いである<sup>1)</sup>。

今日、ノロウイルスは最も患者数の多い感染症といっても過言でない。ノロウイルス対策は厄介なことに食中毒と感染症を起こし、しかも両者は表裏一体であり、両面から対策を行わなければならない。

## ■ノロウイルスの概要

ノロウイルスの構造は、表面が蛋白質で覆われ、エンベロープを有さず、その中にプラス鎖RNAが1本入っているだけの、きわめて単純な構造である。大きさは直径約38nmである。ノロウイル

スは小さく、球形で表面に構造物質が認められることから小型球形ウイルスと呼称されていた。

ノロウイルスは遺伝子型が多く存在し、genogroup (G) がGIとGIIのグループに分けられ、それぞれに15以上の遺伝子型が存在している。遺伝子型が多様なことが簡便かつ信頼性の高い検査法の開発を困難にしている。

ノロウイルスの増殖系は、組織培養、実験動物でいまだに見出されていないので、正確な意味での血清型、感染性が不明である。

なお、食中毒原因物質における本ウイルスの名称は1997年5月に厚生省の食中毒原因物質に「小型球形ウイルス」(現在のノロウイルス)、「その他のウイルス」が加えられ、2002年8月に「小型球形ウイルス」は国際ウイルス命名委員で「ノロウイルス」と命名されたことを受けて、2003年に厚生労働省は「小型球形ウイルス」から「ノロウイルス」に改めた。

## ■ノロウイルス感染症の臨床

ノロウイルスによる食中毒は細菌による事件の少ない12月から2月に多発する。

潜伏期間は通常12~72時間で、感染部位は小腸上皮細胞である。主症状は下痢、嘔吐、嘔気、腹痛で、特に嘔吐は突然、急激に、強烈に起こるのが本症の特徴である。ところ構わず嘔吐することが感染拡大の大きな要因となっている。

これらの症状が1~2日続いた後、治癒する。しかし抵抗力の弱い高齢者や乳幼児では脱水症状が強く、重症となることがあるので注意を要する。1997~2004年にノロウイルスによる食中毒を起こした患者は56,969名で、死亡例はみられていない。

## ■ウイルスによる食中毒の発生状況

2004年に厚生労働省に届けられた食中毒事件は279事件で、原因物質別件数ではカンピロバクターに次いで2位である。原因物質別の患者数は第1位の12,000余名で、全体の45%を占め過去最大となっている。2003年および2004年のノロウイルス以外のウイルスではロタウイルスが2事件（原因食材は不明と冷却水）、A型肝炎（食材不明）および鹿肉の生食によるE型肝炎が各1事件であった。すなわち、ウイルス性食中毒のほとんどはノロウイルスが起因となっている。ウイルス性食中毒発生の予防が完全に遂行されれば、食中毒患者の半数程度を減少させることが可能で、特にノロウイルスの予防が最重要といえる。

## ■ノロウイルスによる食中毒の発生要因

ノロウイルスによる食中毒には3つの様式がある。

### 1. 汚染されたカキ等の二枚貝を介するもの

2004年のノロウイルスによる食中毒事件のうち二枚貝による事件数は14%を占め、患者数は5%程度となっている。2001年に比べると、事件数および患者数ともに半数以下に減少している。本事件はカキが主な原因食材で、その他にウチムラサキガイ、ハマグリ、アカガイ、シジミなどの二枚貝でも発生している。

カキなどの二枚貝がノロウイルスに汚染される様式は、乳幼児でのノロウイルスによる感染性胃腸炎が11月末頃から多発し、それに伴い糞便・吐物から膨大な量のウイルスが排出され、そのまま便器に流すので、ウイルスは下水処理場へいく。

そこで大部分のウイルスは除去されるものの、一部が河川水、海域を汚染する。カキは活発な時期には1日でプランクトン10億個程度を食するため、海水を1時間に10L以上吸引する。海水とともにカキに取り込まれたノロウイルスは中腸腺に濃縮・蓄積する。特に、カキは乳幼児の流行に約1カ月遅れてノロウイルスに汚染される。シジミ、アサリ、ハマグリなどの二枚貝も同様に汚染される。ウイルスに汚染された二枚貝（カキなど）を生あるいは加熱不足で食することにより食中毒となる。食中毒事件は主に飲食店、旅館、家庭で発生し、発生規模は多くが20人以下で起きている。

環境をノロウイルスで汚染させないために、ノロウイルス感染者の糞便・吐物は高濃度の次亜塩素酸ナトリウム液などで不活化した後、便器に流すように努めるようにしないとウイルスが人に戻ってくる。

### 2. 食品取扱者・調理者による食中毒事件

ノロウイルスに感染している食品取扱者・調理者がノロウイルスに汚染された糞便・吐物を食品に付着させることにより食中毒となる。例えば、食品を提供する直前にウイルスが付着した手で直接サラダ、パン、和え物、刺身などを取り扱ったことにより事件が起きている。近年はこの食中毒事件が多発しており、事件数は全体の約70%を、患者数は約80%以上を占めている。しばしば施設、学校等において患者数が100人以上で発生しているのがこの事例の特徴である。食品に糞便・吐物をつけないことが肝要である。

### 3. 飲料水による食中毒

近年、飲料水（井戸水、簡易水道）による事件が、長野<sup>2)</sup>、秋田<sup>3)</sup>、新潟<sup>4)</sup>で発生している。特に料理店、旅館、ホテルでは毎日、提供される料理が変わり、喫食者も異なるが、患者発生は連続的にみられ、原因食材の特定が困難なことが多い。食中毒事件に際しては飲料水も考慮しなければなら

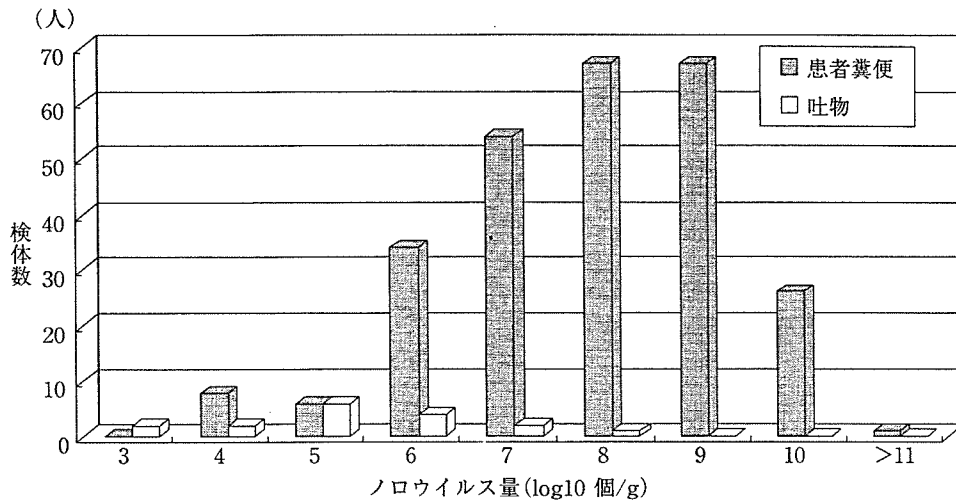


図1 患者糞便および排出吐物のウイルス量

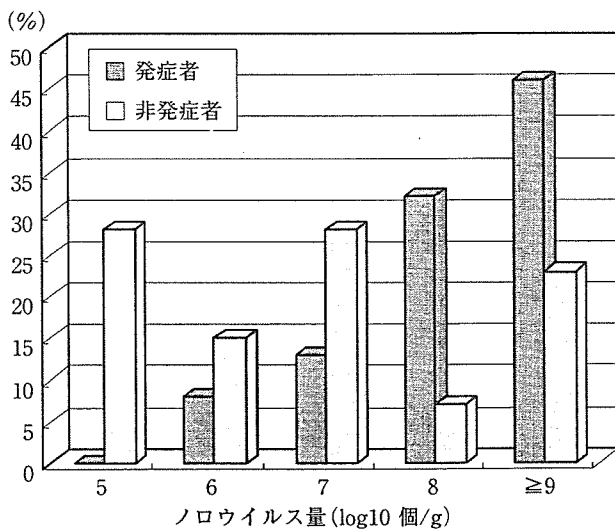


図2 発症者および非発症者の糞便中のノロウイルス量

らない。飲料水による食中毒事件の特徴は井戸水、簡易水道水がノロウイルスに汚染されると、汚染が数日間継続するので、患者発生も連日みられる。飲料水に塩素消毒が適正（残留塩素 0.1ppm）に行われていれば大腸菌は検出されないが、ノロウイルスはこの濃度で不活化されないので食中毒となる。

適正な塩素消毒が行われていないときには先に小さいノロウイルスが飲料水中に漏出し、遅れて大きい大腸菌が検出され、飲料水が糞便に汚染されたことが明白となる。

近年発生した事件はいずれも井戸の深さが10m以内であり、浅井戸は特に注意が必要である。水源では排便、嘔吐をさせない環境対策が必要で、人は環境を守る義務がある。

### ■ノロウイルスによる食中毒事件が多発する要因

ノロウイルスの特徴として感染力が非常に強く、ノロウイルスは10個程度で感染・発病させるのに対し、多くの患者の糞便1g中に1億個以上、吐物では1g中に100万個以上のウイルスが存在する（図1）。したがって、ごく微量の糞便・吐物が手に付着しても、大量のウイルスが存在する。そのような手で食品を汚染することにより、大規模な事件となる。症状が消えても10日間程度、長いときには1カ月ほどウイルスの排出が続くので、この間は食品を直接取り扱わないなどの注意を要する<sup>5,6)</sup>。

何ら下痢などの症状がなくてもウイルスを糞便から排出することがあり（不顕性感染）、患者と同様にウイルスを大量に排出する人もみられる（図2）。人は常にノロウイルスを排出している危険性を持っている。家族、職場などで下痢をしている人がいるときには、自身も感染する危険性が高いので、健康管理に特に注意する。

このウイルスは4℃では数カ月間、室温では2



週間程度は不活化しない。一旦食品に付着したウイルスは長期間感染性を保持することから食中毒となる。さらに物理化学的抵抗性に強い<sup>7,8)</sup>。例えば、消毒用アルコールに強く、細菌が死滅する温度、塩素濃度および強酸性水では容易に不活化しない。酸に強く容易に小腸に達する。不活化は容易ではなく食中毒を起こしうる。

ノロウイルスには遺伝子型が多く（30以上存在する）、1つの遺伝子型に感染しても、他の多くの遺伝子型に感染する。ノロウイルス感染防御抗体は腸管局所のIgA抗体で、IgA抗体は持続が短いので同じ遺伝子型に再感染することがある。したがって乳幼児から高齢者に至るまで何度でも感染する

## ■ノロウイルスによる食中毒の予防対策

食中毒の予防の基本は「持ち込ませない、付着させない、うつさない」である。

### 1. 加熱処理

ウイルス汚染の危険を有する二枚貝は内臓（中心部）が汚染されており、外部を洗っても除去できない。二枚貝、その他の食品、布巾、食器類などの加熱できるものは85℃で1分間以上の加熱を行う。

### 2. 洗 浄

患者の下痢便、嘔吐物ともに液状で、手につきやすい、ウイルスは大きさが細菌に比べ、1/30～1/100であり、手のしわの奥に入り込み、除去が容易でない。料理する前の手洗いは入念に行わなければならない。手指は石鹸を十分泡立て、ブラシなどを使い、流水による温水で洗浄を10秒間以上行う。なお、この操作を2回行うとよい。特に指先、指の間、親指と小指の外側は洗わないことが多いので、この部分も洗う。野菜などの生食する食品は流通段階でウイルス汚染の可能性があるため流水で洗浄する。

### 3. 糞便・吐物の処理

糞便・吐物をただちに処理しないと感染が拡大する。処理するときはマスクとゴム手袋を着用し、自身と周りを汚染させないように注意する。糞便・吐物の処理は新聞紙などで拭き取り、次いで市販の次亜塩素酸ナトリウム液（塩素濃度1,000ppm）に5～10分間浸し、その後、次亜塩素酸ナトリウム液（200ppm）で拭く。

### 4. 調理器具・床の消毒

次亜塩素酸ナトリウム液（塩素濃度200ppm）で拭く。

### 5. 設備の改善

飲食店、旅館、施設、病院などでの水道およびドアの開閉は、自動あるいは足で操作できるものに改善する。外部からのウイルス侵入の防止を目的として、従業員専用のトイレを設置することが望ましい。トイレ内に手洗い場を設置する。

## ■患者の管理等

ノロウイルスによる食中毒患者の糞便・吐物から大量にウイルスが排出されることから、個室での管理が望ましい。患者が多数のときには集団管理とする。患者の部屋には手洗い場を設置し、入退室のときには必ず手洗いを励行する。

次亜塩素酸ナトリウムは刺激が強く、居室、病室の消毒には使えないので、70%消毒用アルコールで3回湿すように拭く。

身の周りの消毒（ドアノブ、手すり、机、電話など）は次亜塩素酸ナトリウム液（200ppm）で湿すように拭く。ただし、金属部分は塩素で腐食するので、10分後によく水に湿したペーパータオルなどで次亜塩素酸ナトリウムを拭き取る。

ノロウイルスの患者にはデスポの食器を使用するのが望ましい。

患者の使用するトイレは固定し、使用ごとにトイレのふた、ドアノブなど、触れたところはすべて次亜塩素酸ナトリウム液（塩素濃度200ppm）

で拭く。未発症者は使用しない。

汚物処理室、洗濯室へは許可された者のみ入室として、他の人は入室禁止とする。

患者は休憩室あるいはプレイルームの使用を禁止、制限する。プレイルームの本、玩具など不特定多数の人が触れるものは撤去する。

#### NOTE

ウイルスによる食中毒の防止に特別な手段はなく、手洗いと汚染の危険性のあるものは加熱あるいは洗浄を行う。感染源はウイルス学的に安全に処理することである。

#### 文献

- 1) 厚生労働省：食中毒統計より。 <http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/index.html>
- 2) 徳竹由美，小林正人，秋山美穂ほか：井戸水からノロ

ウイルスが検出された食中毒事例。感染症学雑誌：印刷中

- 3) 齋藤博之，佐藤寛子，阿部真理子ほか：簡易水道が原因と考えられたノロウイルスの流行—秋田県。病原微生物検出情報 26：150-151, 2005.
- 4) 田村 務，西川 真，飯田和久ほか：飲料水が原因のノロウイルスによる食中毒事例—新潟県。病原微生物検出情報 26：330-331, 2005.
- 5) 西尾 治，新川奈緒美：ノーウォーク様ウイルスによる集団発生。日本醫事新報 4105：5-9, 2002.
- 6) 西尾 治，秋山美穂，愛木智香子ほか：ノロウイルスによる食中毒について。食品衛生学雑誌 46：235-245, 2005.
- 7) Doultree JC, Duruce JD, Brich DS *et al.* : Inactivation of feline calicivirus, a Norwalk virus surrogate. *J Hospital Infect* 41 : 51-57, 1999.
- 8) Duizer E, Bijkerk P, De Groot A *et al.* : Inactivation of caliciviruses. *Appl Environ Microbiol* 70 : 4538-4543, 2004.

\* \* \*

## 混合カキ検体からのノロウイルス濃縮操作における アミラーゼ処理の有用性

野田 衛 西尾 治\*1 山本美和子 伊藤 文明  
池田 義文 松本 勝 荻野 武雄\*2

カキ混合検体からのノロウイルス(NV)濃縮操作におけるアミラーゼ(AM)によるグリコーゲンの消化の有用性を、AM消化を行わない場合およびカキを個体別に検査する場合(個別法)と比較し検討した。AM消化は、ポリエチレングリコールによる沈殿操作時に、1混合検体当たり50mgの $\alpha$ AMを加え、スターラーで攪拌して室温にて一夜行い、他の工程はこれまで当所で実施しているカキ混合検体からの濃縮操作(混合法)に準じた(AM-混合法)。AM-混合法は他の2法と比較して、セカンドリアルタイムPCR法で高いNV検出率を示し、各濃縮法で得られたcDNA検体にG1陽性コントロールcDNAを添加してリアルタイムPCR法で定量した結果、検体のPCR阻害作用を受けにくく、添加量に近い定量値を示した。さらに、 $>0$ コピー/系を陽性としたリアルタイムPCR法の結果とセカンドリアルタイムPCR法の結果の一致率はAM-混合法が最も高かった。以上の結果から、AM-混合法は混合法、個別法と比較し、検体のPCR阻害作用が少なく実際のコピー数に近い定量値が得られ、検出率も高い上、従来の操作とほぼ同じ手順で実施できることから、カキ混合検体からのNV濃縮法として有用と考えられた。

キーワード： ノロウイルス、カキ、アミラーゼ処理、PCR法、定量PCR法

### はじめに

ノロウイルス(NV)による食中毒および食中毒様胃腸炎集団発生はカキを原因食品とする事例が多くを占めることから、本ウイルスによる食中毒の予防にはカキの対策が極めて重要であり、そのためには、カキからの迅速・簡便・確実なNV検出・定量法の確立が前提となる。カキからのNV検出には現在nestedPCR法(定性PCR法)による定性遺伝子検査およびリアルタイムPCR法(定量PCR法)による定量的遺伝子検査が行われている<sup>1)</sup>が、定性PCR法と定量PCR法との検査結果の乖離、前処理法の違いによる定量値のバラツキ、インヒビターによる定量値の信頼性、定量PCR法における陽性(陰性)限界値の問題など幾つかの問題点が指摘されている<sup>2)</sup>。これらに加え、厚生労働省のNV検査指針でカキの個体別の検査が推奨されている一方、同一ロットのカキのNV定量値に個体差があることから個体別の検査では検出率が低くロットの安全性確保ができない場合があり<sup>3)</sup>、複

数のカキを混合した検体からの簡便・確実な濃縮法の開発が望まれている。

一方、カキの検査には中腸腺の切り出しが行われるが、この操作はNVが含まれる中腸腺部分(黒色部分)のみを取り出す目的以外に、検体中に含まれるPCR阻害物質の混入を極力減らすために不要部分(白色部分)を物理的に取り除く目的を持っている。しかし、白色部分を完全に除去することは不可能であり、また、カキを混合した場合、その混入量が増加し定量PCR法による定量値への影響が多いと考えられている。この白色部分の主成分であるグリコーゲンは分子量100万~1000万の多糖類で、アミラーゼ(AM)によってオリゴ糖やデキストランに分解される。従って、AM消化により化学的にグリコーゲンを除去することで、濃縮検体の精製度が増加し、PCR阻害物質の混入が減少する可能性が考えられる。そこで今回我々はカキ混合検体からのNV濃縮操作におけるAMの有用性をAM処理を行わない場合およびカキを個体別に検査する場合と比較した。その結果、AM処理を行うと検出率が増加するとともに、検体のPCR阻害作用が減少し定量値の信頼性が増加する

\*1：国立感染症研究所

\*2：退職

ことを認めたので報告する

## 方 法

### 1 供試カキ

カキ加工業者等から採取された原料用カキおよび NV の食中毒原因究明等のため搬入されたカキを検査材料とした。多くのカキ検体は保冷下で搬入され、直接検査に供した。一部のカキ検体は $-30^{\circ}\text{C}$ 以下に凍結保存されたものを用いた。

### 2 カキ中腸腺からのウイルスの濃縮

#### (1) AM-混合法

1 検体について10 個体程度のカキから中腸腺部分(10g~25g 程度)を切り出し、ストマッキングにより PBS(-)で 10%乳剤にした後、10,000rpm, 30 分、 $4^{\circ}\text{C}$ で遠心分離を行った。その遠心上清に 1/4 量の $\times 5$  ポリエチレングルコール(PEG)溶液(40% PEG6000, 2.5M NaCl)と 50mg の $\alpha$ -AM(和光純薬)を添加し、室温にて一夜スターラーで攪拌し PEG による沈殿と AM による消化を行った。その後、3,000rpm, 15 分粗遠心分離を行った上清を 40%シヨ糖液 3ml に重層し、27,000rpm, 3 時間、 $4^{\circ}\text{C}$ で超遠心分離を行い、沈渣を少量の蒸留水に再浮遊した。

なお、混合法との比較実験では中腸腺 10%乳剤の遠心分離後の上清を 2 等分し、個別法との比較実験では切り出した各中腸腺を 2 等分し、それぞれの試験に供した。

#### (2) 混合法

AM-混合法の PEG 沈殿操作において、AM の添加を行わず、 $4^{\circ}\text{C}$ で一夜静置したことを除き、すべて AM-混合法と同じ操作で実施した。

#### (3) 個別法

各カキから切り出した中腸腺の半分を個別別に検査した。1/2 量の中腸腺が 1g に満たない場合は 2 個体を混合し 1 検体とした。各中腸腺を PBS(-)10ml でストマッキングにより乳剤を作製し、10,000rpm, 30 分、 $4^{\circ}\text{C}$ で遠心分離を行った。その遠心上清を 40%シヨ糖液 3ml に重層し、27,000rpm, 3 時間、 $4^{\circ}\text{C}$ で超遠心分離を行い、沈渣を少量の蒸留水に再浮遊した。

### 3 濃縮材料からのウイルス RNA 抽出と cDNA 合成

濃縮材料からのウイルス RNA 抽出・DNase 処理は、100  $\mu\text{l}$  を抽出材料とし SV total RNA Isolation System(Promega)を用いて行った。Lysis buffer は 1  $\mu\text{g}$  のキャリア RNA(Qiagen)を添加したものを使

用し、精製 RNA は 40  $\mu\text{l}$  の溶出液に回収した。逆転写反応は厚生労働省の NV 検査指針<sup>3)</sup>に準じ、精製 RNA 液 30  $\mu\text{l}$  を Superscript II (GibcoBRL)を用いて、50  $\mu\text{l}$  の反応液量で  $42^{\circ}\text{C}$ , 60 分反応し、cDNA を合成した。プライマーはランダムヘキサマー (Amersham Pharmacia) と オリゴ dT(Amersham Pharmacia)を用いた。

### 4 NV 検出定量 PCR 法

NV 検出定量 PCR 法は cDNA 検体 5  $\mu\text{l}$  を鋳型として Kageyama らの方法<sup>4)</sup>によるリアルタイム PCR 法で NV 遺伝子 1 群(G1)および NV 遺伝子 2 群(G2)に属するウイルスをそれぞれ特異的に増幅し、検出・定量した。すなわち、G1 は COG1F/COG1R のプライマー組と、RING1-TP(a), RING1-TP(b)のプロープ、G2 は COG2F/COG2R のプライマー組と RING2AL-TP のプロープを用い、 $54^{\circ}\text{C}$ , 15 分の初期反応後、 $94^{\circ}\text{C}$ , 30 分、 $56^{\circ}\text{C}$ , 1 分のシャトル PCR 反応を 45 回繰り返した。定量値は原則として実測値(cDNA 検体 5  $\mu\text{l}$  に含まれるコピー数)で示した。

### 5 NV 検出定性 PCR 法(セカンドリアルタイム PCR 法)

NV 検出定性 PCR 法は nestedPCR 法の 2 回目の PCR 反応をリアルタイム PCR 法で検出するセカンドリアルタイム PCR 法<sup>5)</sup>で行った。すなわち、cDNA 検体 5  $\mu\text{l}$  を鋳型として COG1F/G1SKR あるいは COG2F/G2SKR のプライマー組で ExTaqR(宝酒造)を用い PCR 反応(反応条件は、初期変性反応  $95^{\circ}\text{C}$ , 5 分, PCR 反応  $95^{\circ}\text{C}$ , 30 秒,  $50^{\circ}\text{C}$ , 30 秒,  $72^{\circ}\text{C}$ , 1 分を 35 回, 最終伸長反応  $72^{\circ}\text{C}$ , 10 分)を行った後、それぞれの PCR 産物 1  $\mu\text{l}$  を鋳型 DNA として上述のリアルタイム PCR 法を行い、G1, G2 を特異的に検出した。

### 6 陽性コントロールおよび陽性コントロール添加実験

西尾によって作製された G1 あるいは G2 の NV 遺伝子挿入プラスミド(COG1F/G1SKR で増幅した G1 株 DNA 断片あるいは COG2F/G2SKR で増幅した G2 株 DNA 断片を TA クローニング法により導入したもの)を持つ大腸菌から、プラスミドを抽出し、OD 値からコピー数を算出後、DW で 10 倍階段希釈し、 $10^8$  コピー/ $5 \mu\text{l}$  ~  $10^0$  コピー/ $5 \mu\text{l}$  の標準 DNA を得た(検量線は  $R=0.99$  以上)。定量 PCR 法には、 $10^6$  コピー/ $5 \mu\text{l}$ ,  $10^4$  コピー/ $5 \mu\text{l}$ ,  $10^2$  コピー/ $5 \mu\text{l}$  の希釈標準 DNA を逆転写反応液(逆転写酵素以外の試薬類を至適濃度含む緩衝液)