

2) 市川高子、大塚有加、近藤玲子、豊嶋千俊、大瀬戸光明、井上博雄：愛媛県におけるヒト・メタニューモウイルス及び RS ウイルスの検出状況. 第 23 回中国四国ウイルス研究会、2007.6、愛媛県

3) 市川高子、大塚有加、近藤玲子、大瀬戸光明、井上博雄：愛媛県における急性気道感染症からのヒト・メタニューモウイルス及び RS ウイルスの検出. 第 66 回日本公衆衛生学会総会、2007.10、愛媛県

4) 近藤玲子、大瀬戸光明、市川高子、井上博雄：愛媛県の日本紅斑熱熱発生と患者発生地域でのマダニ類の *Rickettsia japonica* 保有状況. 第 66 回日本公衆衛生学会総会、2007.10、愛媛県

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

表 1 平成 19 年度輸入食品の月別・輸入国別の検査数

国 別	食品種別	5 月	6 月	7 月	8 月	9 月	10 月	11 月	12 月	1 月	2 月	計
韓 国	アカガイ	2	3	4	3	3	4	3	2	1	2	27
中 国	アカガイ	1						1	2	3	2	9
	ハマグリ	1	1		1	1						4
計		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	40

表 2 平成 19 年度輸入貝類のウイルス汚染状況

買上月	産地	食品の種類	NV			HAV	
			Real time PCR copies/g		PCR	Real time PCR copies/g 平均	PCR
			G I 平均	G II 平均			
2007.6	韓国	アカガイ	[0.2]	Ud	—	Ud	—
2007.7	韓国	アカガイ	[5.8]	Ud	—	Ud	—
"	韓国	アカガイ	[1.2]	Ud	—	Ud	—
2007.8	韓国	アカガイ	Ud	[0.1]	—	Ud	—
2007.9	韓国	アカガイ	Ud	[1.9]	—	Ud	—
"	韓国	アカガイ	Ud	[0.8]	—	Ud	—
2007.10.	韓国	アカガイ	[2.5]	Ud	—	Ud	—
2007.11.	中国	アカガイ	[2.3]	Ud	—	Ud	—
"	韓国	アカガイ	[1.2]	[0.1]	—	Ud	—
2007.12	中国	アカガイ	[0.4]	Ud	—	Ud	—
"	中国	アカガイ	[5.5]	Ud	—	Ud	—
2008.1.	中国	アカガイ	[31.0]	Ud	—	Ud	—
"	中国	アカガイ	[0.6]	[2.4]	—	Ud	—
"	中国	アカガイ	[0.5]	Ud	—	Ud	—
"	韓国	アカガイ	[33.7]	Ud	—	Ud	—
2008.2	中国	アカガイ	[13.9]	[0.6]	—	Ud	—
"	中国	アカガイ	[0.7]	Ud	—	Ud	—

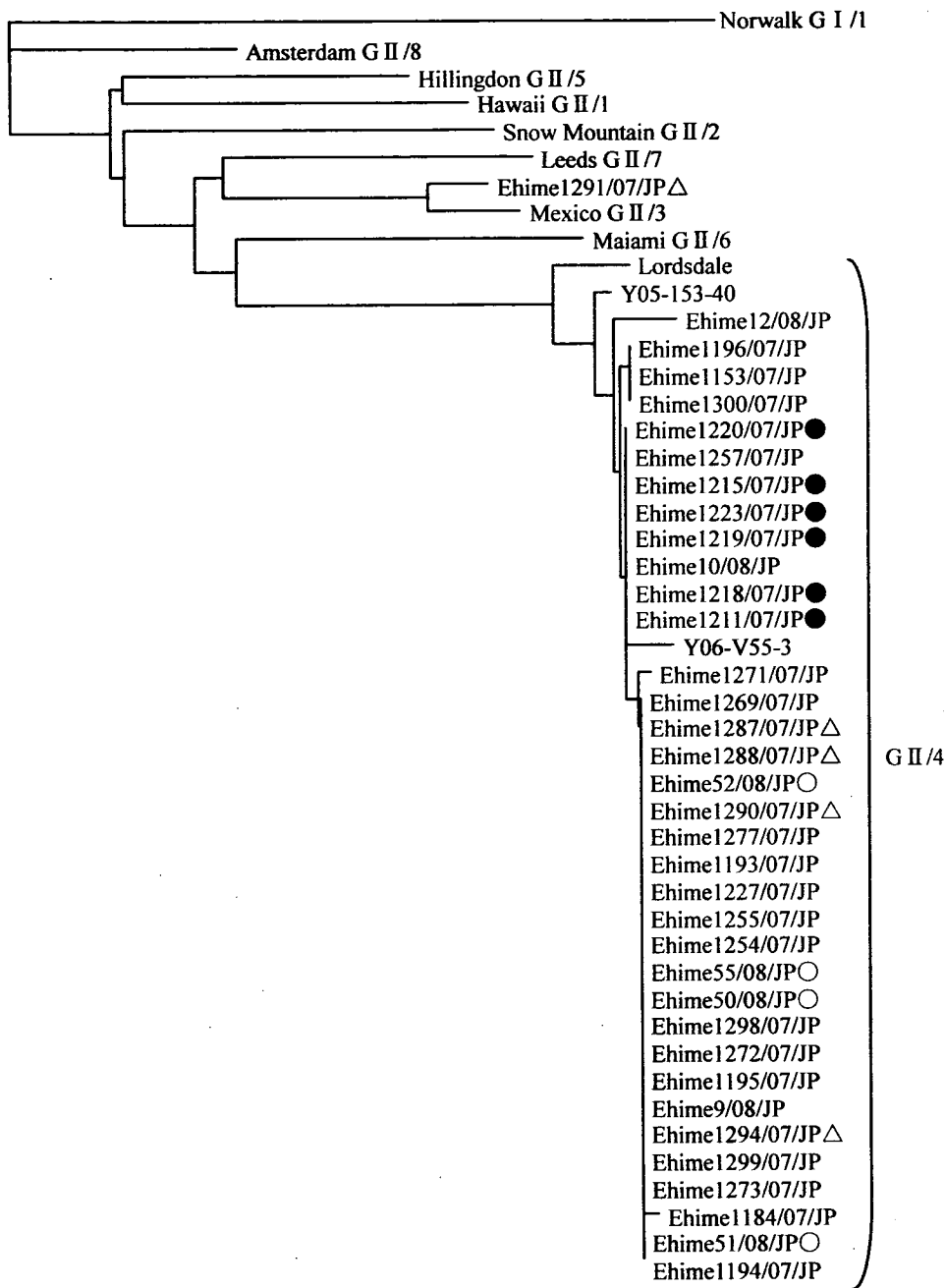
[]はテストチューブあたり(cDNA 4μl)の NV コピー数が 10 コピー以下

表3 ウイルスが検出された集団発生事例(2007.1.-2008.3.)

事例 No.	発生時期	発生施設	原因食品	ウイルス陽性数/検査数			検出ウイルス
				患者	調理従事者 (有症者)	食品 ふきとり	
1	2007.2.	家庭	仕出料理	4/4			NV GII/*
2	2007.3.	学生寮	給食	9/13	0/2	0/12	NV GII/*
3	2007.4.	飲食店	弁当	4/5	7/7		NV GII/*
4	2007.5.	飲食店	弁当	3/6	0/4		NV GII/*
5	2007.10.	結婚式場	会席料理	19/43	3/8	0/14	SV GIV
6	2007.12.	福祉施設	給食	7/9	2/4	1/4	NV GII/4
7	2007.12.	飲食店(県外)	昼食	5/5			NV GII/*
8	2007.12.	飲食店	会席料理・弁当	4/4	1/2	1/1	NV GII/4
9	2007.12.	飲食店	会席料理	1/2	3/4		NV GII/*
10	2008.1.	飲食店	会席料理	5/5	1/2	0/5	NV GII/4
11	2008.2.	飲食店	会席料理	8/8	(1)1/3(1)		NV GII/*
12	2008.2.	飲食店	ヒト(嘔吐物)→ヒト	3/3	1/1	3/3	NV GI(調理者) GII(患者・ふき取り)/*
13	2008.2.	飲食店	弁当	16/17	3/4	1/7	NV GII/*
14	2008.2.	宿泊施設	食事		2/5	1/10	NV GI (調理者1人はGII)
15	2008.3.	飲食店	昼食	10/10	3/9	0/5	NV GI (調理者1人はGII)

食品(カキ):NVGII/3

*:型別解析中



0.1

図 1 NV の塩基配列系統樹解析

集団発生事例: Ehime1211/07/JP~1223/07/JP ●
 Ehime1287/07/JP~1294/07/JP Δ
 Ehime50/08/JP~55/08/JP ○

平成19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
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

輸入食品のウイルス汚染状況に関する研究

主任研究者	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
	菊池正吾	愛知医科大学公衆衛生学
	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 43 件のうち、13 件 (30%) から NV が検出された。韓国産アカガイの 7 件中 3 件 (43%)、韓国産タイラギの 9 件中 3 件 (33%) から NV が検出され、韓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、千葉県中央卸売市場に 2007 年 5 月～2008 年 2 月の間に搬入された、中国産ハマグリ 12 件、アカガイ 11 件、カキ (フライ) 1 件、韓国産タイラギ 9 件、アカガイ 7 件、バカガイ 1 件、ロシア産アカガイ 2 件の計 43 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遠心法 (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 を用い、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、カプ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クエ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43件中から、NVが13件(30%)
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。7月に中国産アカガイ、ロシア産

アカガイから NV が検出されたが、8～9月
は検出されず、その後、10～12月にかけて
検出率が上昇した。

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
5	5	0	0%	0	0%
6	4	0	0%	0	0%
7	5	2	40%	0	0%
8	4	0	0%	0	0%
9	4	0	0%	0	0%
10	4	2	50%	0	0%
11	4	3	75%	0	0%
12	4	4	100%	0	0%
1	4	0	0%	0	0%
2	5	2	40%	0	0%
計	43	13	30%	0	0%

種類別のNV汚染状況は、バカガイが1件中
1件(100%)、アカガイが20件中7件(35%)、
タイラギが9件中3件(33%)、ハマグリが

12件中2件(17%)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
バカガイ	1	1	100%	0	0%
アカガイ	20	7	35%	0	0%
タイラギ	9	3	33%	0	0%
ハマグリ	12	2	17%	0	0%
カキ(フライ)	1	0	0%	0	0%
計	42	12	29%	0	0%

国別のNV汚染状況は、韓国産が17件中7
件(41%)で、バカガイの1件中1件(100%)、
アカガイの7件中3件(43%)、タイラギの
9件中3件(33%)からNVが検出された。

また、中国産が24件中5件(21%)で、ア
カガイの11件中3件(27%)、ハマグリ
の12件中2件(17%)からNVが検出された。
(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
ロシア	2	1	50%	0	0%
韓国	17	7	41%	0	0%
中国	24	5	21%	0	0%
計	2	1	50%	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。Nested PCR 法で検出されたものは 12 検体で、GII が 7 株、GI が 5 株検出されたが、GII/4 が 3 株と最も多かった。

そのほか GII/3 が 3 株、GI/4 が 2 株検出された以外は GI/10、G2/6、GII/16、AY641760 類似株、AY356543 類似株がそれぞれ 1 株ずつ検出された。

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	2	韓国	バカガイ	2
	GI/10	1	ロシア	アカガイ	1
	GI/不明	2	中国	アカガイ	1 ^{※1}
			韓国	アカガイ	1 ^{※2}
GII	GII/3	2	中国	アカガイ	1
			中国	ハマグリ	1
	GII/4	3	韓国	アカガイ	1
			韓国	タイラギ	1
			韓国	バカガイ	1
			韓国	バカガイ	1
	GII/6	1	韓国	バカガイ	1
GII/16	1	韓国	バカガイ	1	

※1:AY641760類似株

※2:AY356543類似株

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 15 検体で GII が 13 件、GI が 2 検体であった。15 検体のコピー数は 1g あたり 241~1,937 コピーで、平均は 726 コピーであった。韓国産アカガイが 265~1,937 コピーで平均 994 コピー、中

国産アカガイが 717~1,020 コピーで平均 869 コピー、中国産ハマグリが 470~739 コピーで平均 598 コピー、韓国産タイラギが 312~970 コピーで平均 537 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 3 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

種類	国	遺伝子群	copy/g
アカガイ	韓国	GII	1,937
アカガイ	韓国	GII	1,470
アカガイ	中国	GII	1,020
タイラギ	韓国	GII	970
アカガイ	韓国	GII	905
ハマグリ	中国	GII	739
アカガイ	中国	GI	717
ハマグリ	中国	GII	583
タイラギ	韓国	GII	529
ハマグリ	中国	GII	470
アカガイ	韓国	GII	393
タイラギ	韓国	GII	337
タイラギ	韓国	GII	312
アカガイ	韓国	GII	265
バカガイ	韓国	GI	241

D. 考察

昨年度に比べ、韓国産からの NV 検出率が上昇し、中国産の検出率が低下したが、全体として輸入魚介類の 30% から NV が検出され、汚染度は昨年度と同程度であった。リアルタイム PCR で輸入魚介類中の NV コピー数を定量したが、平均 726 コピーと低く、検出を困難としていることを示唆した。また、Nested PCR により検出した NV をダイレクトシーケンスし、塩基配列を決定したが GII/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。なお、GII/4 は韓国産アカガイ (11 月採取)、韓国産タイラギ (12 月採取)、韓国産バカガイ (2 月採取)、GII/3 は中国産ハマグリ (12 月採取)、中国産アカガイ (2 月採取) など、魚介類の種類や採取月に係わらず産地により相関性の高い遺伝子型が検出される傾向が見られた。その一方、GI では前年度に引続き、本邦での検出が見られない AY641760 や AY356543 類似株などが検出され、これらの遺伝子型がアジアで継続して汚染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

2007 年 5 月～2008 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 43 件中 13 件 (30%) から NV が検出された。HAV は検出されなかった。

F. 研究発表

1) 論文発表

- Hansman GS, Oka T, Okamoto R, Nishida T, Toda S, Noda M, Sano D, Ueki Y, Imai T, Omura T, Nishio O, Kimura H, Takeda N. Human sapovirus in clams, Japan. *Emerg Infect Dis*, 13(4):620-622, 2007.
- Fujimoto T, Shinohara M, Ito M, Okafuji T, Okafuji T, Nishio O, Yoshida H, Shimizu H, Chikahira M, Phan TG, Ushijima H. Detection of dual-infected cases of adenoviruses and coxsackieviruses type B by real-time PCR but not by the conventional viral culture technique. *Clin Lab*, 53(9-12):605-609, 2007.
- Khamrin P, Nguyen TA, Phan TG, Satou K, Masuoka Y, Okitsu S, Maneekarn N, Nishio O, Ushijima H. Evaluation of immunochromatography and commercial enzyme-linked immunosorbent assay for rapid detection of norovirus antigen

in stool samples. J Virol Methods, 147:360-363, 2007.

Dey SK, Phan TG, Nguyen TA, Nishio O, Salim AFM, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Prevalence of sapovirus infection among infants and children with acute gastroenteritis in Dhaka City, Bangladesh during 2004-2005. J Med Virol, 79: 633-638, 2007.

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): 177-184, 2007.

Phan TG, Khamrin P, Akiyama M, Yagyu F, Okitsu S, Maneekarn N, Nisio O, Ushijima H. Detection and genetic characterization of Norovirus in oyster from China and Japan. Clin Lab, 53 (7, 8): 405-412, 2007.

2) 学会発表

李天成, 岡本玲子, 有田知子, 田中靖人, 溝上雅史, 宮村達男, 脇田隆字, 武田直和. キメラマウスにおけるE型肝炎ウイルスの複製. 第55回日本ウイルス学会学術集会, 2007. 10. 21-23. 札幌.

野田衛, 岡本玲子, 有田知子, 伊藤文明, 池田義文, 西尾治. 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(2). 第55回日本ウイルス学会学術集会, 2007. 10. 21-23. 札幌.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

平成19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
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
輸入生食用カキのウイルス汚染状況に関する研究

主任研究者：西尾 治 国立感染症研究所
協力研究者：有田知子 独立行政法人日本スポーツ振興センター
岡本玲子 山口県環境保健センター

研究要旨

ウイルス性食中毒の主要な原因の一つであるとされる生カキの安全確保を目的として、2007年6月 - 8月の輸入生食用カキ47検体のノロウイルス (NoV) とA型肝炎ウイルス (HAV) 汚染状況調査をRT-PCRによる遺伝子解析とリアルタイムPCR法による定量により行った。RT-PCR検査で、NoV、HAV遺伝子は検出されなかった。リアルタイムPCR法によるNoVの定量では、いずれも実測値が10コピー以下であったが、継続的なモニタリングが必要であると考えられた。

A. 研究目的

カキの生食は、依然ウイルス性食中毒の主要原因の一つである。国産カキの生食はほぼ冬季に限られているが、国外から輸入されている生食用カキは年間を通じて提供され、ウイルス性食中毒の感染源になっている可能性があるため、輸入生食用カキについてNoV、HAVの汚染状況調査を行った。

B. 研究方法

材料：材料：2007年6月 - 8月に輸入された生食用カキ47 (産地：アメリカ28、オーストラリア16、イギリス3) ロットを用い、1ロットにつき3個を個別に検査した。

方法：カキの中腸腺を取り出し、秤量し、10%乳剤とした後、アミラーゼ (30mg/mL) を加え、室温で30分振とう後、4°Cで一晩放置した。10,000rpmで20分間冷却遠心し、NaClを最終濃度1M、ポリエチレングリコール6000を最終濃度12%となるよう上清に加え、4°Cで一晩放置し、10,000rpmで20分間冷却遠心した。その沈渣を140μLのDDWに再浮遊し、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RING-TP1TaqManプローブを用いた、影山らによる方法で、NoV GenogroupI (NoV GI)、NoV GenogroupII (NoV GII)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：カキ1個あたり125コピー) 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、NoV 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、NoV 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。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、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 v1.1 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/14、GII/1~GII/17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。

C. 研究結果

RT-PCRによる検査の結果、調査した輸入生食用カキからは、NoV、HAV遺伝子は検出されなかった(表1)。リアルタイムPCR法による定量では、NoV Genogroup I、NoV Genogroup IIは、いずれも実測値が10コピー以下であった。

表1 月別NoV・HAV汚染状況

検体採取 年月	調査 ロット数	NoV 陽性 ロット数 (real time PCR/RT-PCR)	HAV 陽性 ロット数 (RT-PCR)
'07年6月	7	0	0
'07年7月	21	0	0
'07年8月	19	0	0
計	47	0	0

D. 考察

調査した輸入生食用カキからは、NoV、HAV遺伝子は検出されなかったが、依然HAVの感染源として、カキの喫食が多くを占めている。国内のA型肝炎の浸淫度は低く、患者便により国内産カキが汚染されている可能性は低いと考えられる。よって国内でのカキ喫食による患者発生は、輸入カキの関与が疑われる。輸入生食用カキは年間を通じて提供されているため、今後、検査月とロット数を増やして継続的なモニタリングが必要と考えられた。

E. 研究発表

1)論文発表

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.
Human sapovirus in clams, Japan. *Emerg. Infect. Dis.* 13(4):620-622,(2007)

2)学会発表

・李天成、岡本玲子、有田知子、田中靖人、溝上雅史、宮村達男、脇田隆字、武田直和
キメラマウスにおけるE型肝炎ウイルスの複製
第55回日本ウイルス学会学術集会

・野田衛、岡本玲子、有田知子、伊藤文明、池田義文、西尾治
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(2)
第55回日本ウイルス学会学術集会

・Tomoichiro Oka, Tomoko Arita-Nishida, Mamoru Noda, Daisuke Sano, You Ueki, Takahiro Imai, Tatsuo Omura, Osamu Nishio, Hirokazu Kimura, Naokazu Takeda, and Grant S. Hansman
Detection of human sapovirus from clams in brackish water
14th International Symposium on Health-Related Water Microbiology

F. 知的財産の出願・登録状況

特になし

分担研究報告

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

原田 美樹 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 千葉県食品衛生検査所

藤本 嗣人 国立感染症研究所

研究要旨

輸入食品のウイルス汚染状況を把握するため、平成19年5月から平成20年2月までに輸入された生鮮魚介類におけるノロウイルス (NV) およびA型肝炎ウイルス (HAV) の汚染状況を調査した。中国、韓国、フィリピン、インドネシアから輸入された40検体についてリアルタイム PCRとNested PCRによりNVおよびHAVの検出を試みた。その結果、NVが8検体 (20.0%)、HAVが2検体 (5.0%) から検出された。中国産アカガイ9検体中2検体 (22.2%)、中国産ハマグリ12検体中4検体 (33.3%) からNVが検出され、中国産の二枚貝の汚染率が高かった。またHAVはフィリピン産ブラックタイガーとインドネシア産エビから検出された。

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。

B. 研究方法

平成19年5月から平成20年2月まで毎月4検体ずつ合計40検体の中国、韓国からの二枚貝29検体およびフィリピン、インドネシアからのエビ類11検体について検査した。

検査は1検体につき3回行った。二枚貝は中腸

線、エビ類は背腸を約1g、PBS(-)で10%乳剤を作製し、40,000rpmで2時間超遠心し、ウイルス濃縮を行い、沈渣全てにPBS(-)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 I(Takara)処理後、Random Hexamer(Amersham)を用いてSuper ScriptII(Invitrogen)で逆転写してcDNAを作製した。このcDNAをもとにNVおよびHAVともにリアルタイム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GIではCOG1F/COG1R、GIIではCOG2F/COG2Rを用い、プローブはTaq Man プローブ(ABI)でGIはRING1-TP(a)とRING1-TP(b)、GIIはRING2-TPを用いた。Nested PCRにはGIでは、1st用プライマーはCOG1F/G1-SKR Nested用はG1-SKF/G1-SKR、GIIでは、1st用プライマーはCOG2F/G2-SKR Nested用はG2-SKF/G2-SKRを用いた。

HAVのリアルタイムPCRのプライマーはHAV449/HAV557を用い、プローブはTaq Man プローブ(ABI)でHA+482-P-FAMを用いた。Nested PCRでは、1st用プライマーはHAV+2799/HAV-3273、Nested用はHAV+2907/HAV-3162を用いた。リアルタイムPCRでは実測値が10コピー以上のもの陽性とした。Nested PCRで増幅されたPCR産物についてダイレクトシーケンスで塩基配列を決定した。

C. 研究結果

リアルタイムPCRおよびNested PCRで40検

体中8検体(20.0%)からNVが検出され、2検体(5.0%)からHAVが検出された。月別のNVおよびHAVの汚染状況を表1にまとめた。NVは5月、6月、7月、12月、2月に検出された、HAVは5月と9月に検出された。

国別の検体では中国産21検体中6検体(28.6%)、韓国産8検体中1検体(12.5%)、フィリピン産10検体中1検体(10.0%)からNVが検出された。またはフィリピン産10検体中1検体(10.0%)、インドネシア産1検体中1検体(100%)からHAVが検出された(表2)。

NVのNested PCR陽性となった検体について、現在までに4例シーケンスを行った。5月の中国産ハマグリはSwineの株に近縁であった。5月の中国産アカガイと6月の中国産ハマグリはGII/4 Lordsdaleに近縁であった。7月の中国産ハマグリはGI/4 Valettaに近縁であった。また5月のフィリピン産ブラックタイガー1検体から検出されたHAVの遺伝子型は1aであった。

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。生鮮魚介類40検体のNVによる汚染は20.0%であったが、中国産の二枚貝では28.6%と高率であった。シーケンスにより検出されたGII/4は日本国内で流行している株とほぼ同じであり、アジアで同様の株が流行していると思われる。

HAVが検出されたのはエビ類であり、二枚貝からの検出はみられなかった。A型肝炎の潜伏期は約1ヵ月と長いため原因食品の究明は難しいが、エビ類のHAV汚染についても注意する必要があると思われた。

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。

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

平成19年5月から平成20年2月に輸入された

生鮮魚介類40検体中8検体（20.0%）から NV が、2検体（5.0%）からHAVが検出された。

F. 研究発表

論文

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18年度）、神奈川県研報告 37:72-74 2007

G. 知的財産の出願・登録状況

特になし

表1. 輸入食品月別汚染状況

月	原産国	種類	検体数	陽性数		
				NV		HAV
				G1	G2	
5月	中国	ハマグリ	1	0	1	0
	中国	アカガイ	1	0	1	0
	韓国	タイラガイ	1	0	0	0
	フィリピン	ブラックタイガー	1	0	0	1
6月	フィリピン	ブラックタイガー	1	0	0	0
	中国	ハマグリ	1	0	0	0
	中国	アカガイ	1	0	1	0
	韓国	タイラガイ	1	0	0	0
7月	中国	ハマグリ	1	1	0	0
	中国	アカガイ	1	0	0	0
	フィリピン	ブラックタイガー	1	0	0	0
	韓国	アカガイ	1	0	0	0
8月	韓国	タイラガイ	1	0	0	0
	中国	ハマグリ	1	0	0	0
	中国	ハマグリ	1	0	0	0
	フィリピン	ブラックタイガー	1	0	0	0
9月	中国	アカガイ	1	0	0	0
	中国	ハマグリ	1	0	0	0
	フィリピン	ブラックタイガー	1	0	0	0
	インドネシア	エビ	1	0	0	1
10月	中国	ハマグリ	1	0	0	0
	中国	アカガイ	1	0	0	0
	フィリピン	ブラックタイガー	1	0	0	0
	中国	ハマグリ	1	0	0	0
11月	中国	アカガイ	1	0	0	0
	フィリピン	ブラックタイガー	1	0	0	0
	韓国	タイラガイ	1	0	0	0
	中国	ハマグリ	1	0	0	0
12月	韓国	アカガイ	1	0	0	0
	中国	アカガイ	1	0	0	0
	フィリピン	タイラガイ	1	0	0	0
	中国	ハマグリ	1	1	0	0
1月	中国	アカガイ	1	0	0	0
	中国	ハマグリ	1	0	0	0
	フィリピン	ブラックタイガー	1	0	0	0
	韓国	タイラガイ	1	0	0	0
2月	中国	ハマグリ	1	0	0	0
	韓国	タイラガイ	1	0	1	0
	中国	アカガイ	1	1	0	0
	フィリピン	ブラックタイガー	1	0	1	0
合計			40	3	5	2

表2. 輸入食品国別汚染状況

原産国	種類	検体数	NV			HAV	
			陽性数		陽性率	陽性数	陽性率
			G1	G2			
中国	アカガイ	9	1	1	22.2	0	
	ハマグリ	12	2	2	33.3	0	
韓国	アカガイ	2	0	0		0	
	タイラガイ	6	0	1	12.5	0	
フィリピン	ブラックタイガー	10	0	1	10.0	1	10.0
インドネシア	エビ	1	0	0		1	100.0
合計		40	3	5	20.0	2	5.0

平成 19 年厚生労働科学研究費補助金
(食品の安全・安心確保推進研究事業)

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状況について

主任研究者：西尾 治(国立感染症研究所)

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(愛知県食品衛生査所)

研究要旨

食品のウイルス学的安全・安心確保事業の一環として、輸入魚介類からのノロウイルス(NV)、A型肝炎ウイルス(HAV)およびE型肝炎ウイルス(HVE)の汚染状況を調査した。

平成 19 年 5 月から平成 20 年 2 月の期間に、韓国および中国から輸入されたアカガイ 39 ロット(117 検体)、ハマグリ 1 ロット(3 検体)の計 40 ロット(120 検体)について、リアルタイム PCR および RT-PCR で検出を試みた。その結果、NV の Genogroup II が 120 検体中 21 検体(17.5%)から検出された。リアルタイム PCR で検出された貝類中からの NV 量についてみると、実測値は 10 コピー/g から 10^2 コピー/g の範囲内であった。また、検出された遺伝子群、遺伝子型は、Genogroup II (GII) に属しており、一部をシーケンス解析したところ、遺伝子型は GII/4 に分類された。

輸入食品類のウイルス汚染を把握することは、国民の健康危機管理対策上と重要な問題であり継続した調査を実施していくことが重要である。

A. 研究目的

最近、NV による患者数の報告が食中毒事例、感染症事例として大きく取り上げられている。感染源として食品汚染、人を介しての感染が問題となっている。

我が国は多くの輸入食品が輸入されており、輸入食品の安全性の把握は状況は重要であるがウイルス学的評価はなされていない。そこで、輸入魚介類のウイルス汚染状況の実態を把握するために、NV、HAV および HEV の検出を試みた。また、これらの検査材料から検出された NV の遺伝子型について解析を試みた。

B. 研究方法

検査材料：平成 19 年 5 月から翌年 2 月の期間に、愛知県内に輸入されたアカガイは 39 ロット 117 検体(韓国産 93 検体、中国産 24 検体)およびハマグリは 1 ロット 3 検体(中国産)、計 40 ロットの 120 検体を用いた。貝類は各ロットにつき中腸腺の約 1g を 1 検体し、各ロットにつき 3 検体を検査に用いた。

検査材料の前処理：野田らの報告しているアミラーゼ法による濃縮方法を用いた。すなわち、中腸腺の重量に対し、9 容量の PBS(-)を加え、マルチビーズショッカーを用い、10 程度強く振り中腸腺を粉碎後、

10,000rpm/30分間遠心し、上清を10ml採取する。そして、ポリエチレングリコール6,000を最終濃度12%、NaClを最終濃度で1Mに加え、 α アミラーゼを約25mgを加え、室温で一晩放置する。そして、3,000rpm/20分間遠心し、上清を転倒除去した後、キムタオル上に逆さにして、しばらく放置する。その後、ペレットに滅菌蒸留水250 μ lを加え、攪拌した後、微量遠心管に移し、12,000rpm/5分遠心した上清をRNA抽出試料とした。

RNA抽出: QIAamp Viral RNA Mini Kit(Qiagen)を用い、添付のマニュアルに従った。

NVの検出: NVの検出には影山らの報告に準じたリアルタイムPCRで行った。即ち、COGF/RプライマーとRING-TPタックマンプローブを用い、COGF/RプライマーとRING-TPタックマンプローブを用いLight Cyclerで測定し、既知濃度国立感染症研究所、西尾治博士から分与)のNV陽性コントロールも用い、実測値で10コピー以上のものを陽性とした。また、NVのRT-PCRでは、1st PCRプライマーとしてCOG1/G1SKR、COG2/G2SKRを用い、Nested PCRプライマーは、G1・2SKF/Rを用いた。

遺伝子解析: リアルタイムPCR法で検出されたcDNAについて、キャプシド領域の一部を増幅するCOG2F/G2-SKF、G2-SKF/G2-SKRプライマーを用いてPCR法を実施し、得られPCR産物についてダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定した。また、ジェノタイプは、片山らの方法に基づき、レファレンス株と共に近隣結合法による分子系統樹を作成し決定した。

HAV遺伝子の検出: HAV検出方法は、リ

アルタイムPCRでは西尾らが設定したHAV449プライマーとHAV557プライマーを用いたタックマンプローブ法で行い、Light Cyclerで測定した。また、HAVのRT-PCRは、1st PCRプライマーとしてHAV2779とHAV3273を用い、Nested PCRプライマーはHAV2907とHAV3156を用いた。

HEV遺伝子の検出: HEVのRT-PCRでは、1st PCRプライマーとして、HECOM-S/HECOM-ASを用い、Nested PCRプライマーは、HECOM/HECOM-ASを用いた。

C. 結果

1) 輸入魚介類からのウイルス検出状況

平成19年5月から翌年2月の期間、愛知県で購入された輸入貝類計40ロット(120検体)を調査した。輸入国別では、韓国産のアカガイ31ロット、中国産アカガイ8ロットおよびハマグリ1ロットであった(表1)。

リアルタイムPCRおよびRT-PCRによるNVとHAV遺伝子の検出状況では、NVが検出された検体は40ロット中16ロット(40%)から確認され、国別の状況では韓国産からは31ロット中13ロット(41.9%)にアカガイから検出され、中国産からは8ロット中2ロット(25%)のアカガイから検出された。また、アカガイ以外の中国産のハマグリ1ロットから検出され、検出された遺伝子型はすべてGIIに分類された(図1、表2)。

リアルタイムPCRで得られたウイルスコピー数の分布は、実測値で 10^2 コピー数以下であり貝類に含まれているウイルス量は微量であった(表3)。

遺伝子解析はカプシド領域の一部(344bp)を増幅する G2SKF/R プライマーを用いて、PCR を実施し得られた PCR 産物についてダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定したところ、いずれも GII/4 であつた(表 4)。

D. 考察

輸入魚介類のウイルス汚染状況を把握するため、平成 19 年 5 月から翌年 2 月に愛知県で購入されたアカガイ、ハマグリの中腸腺から NV、HAV および HEV について検出を試みた。

今回、中腸腺を処理する方法として野田らが報告しているアミラーゼ処理方法を取り入れて実施したところ、NV が韓国・中国産の養殖アカガイ、自生アカガイ、養殖ハマグリなど 40 ロット中 16 ロット(40%)がリアルタイム PCR および RT-PCR で検出された。また、検査は 1 ロットにつき 3 検体を実施したが、NV が検出されたロットの中で 3 検体全ての検体から検出されず、貝類に個体差が確認された。

アカガイ、ハマグリは約 1 年間の養殖期間を経て出荷されており、その海域、汽水域はヒトの間で流行している NV の影響を直接受けていることが知られているが、今回の調査から、2006~2007 年、世界的に流行を起こした NV の GII/4 が 2007 年 5 月から翌年 1 月まで確認され、ヒトの間で大流行していた NV の GII/4 が貝類においても優先的に検出されたものと思われる。

輸入食品類のウイルス汚染を把握することは、健康危機管理対策上と重要な問題であり継続した調査を実施し、情報提供して

いくことが重要であると思われる。

E. まとめ

輸入貝類のウイルス汚染状況を把握するためにリアルタイム PCR および RT-PCR による NV、HAV および HEV 遺伝子の検出を行った。

平成 19 年 5 月から翌年 2 月の期間に 40 ロットの輸入貝類を検査し、アカガイ、ハマグリから NV を 16 ロット(41%)から検出した。また、検出された NV の遺伝子型はすべて NV の GII/4 に属していた。

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 月別・輸入食品の検査数

産地	種類	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	計
韓国	アカガイ	9 (3)	12 (4)	12 (4)	9 (3)	15 (5)	12 (4)	9 (3)		6 (2)	9 (3)	93 (31)
中国	アカガイ							3 (1)	12 (4)	6 (2)	3 (1)	24 (8)
	ハマグリ	3 (1)										3 (1)
	計	12 (4)	12 (4)	12 (4)	9 (3)	15 (5)	12 (4)	12 (4)	12 (4)	12 (4)	12 (4)	120 (40)

()内ロット数

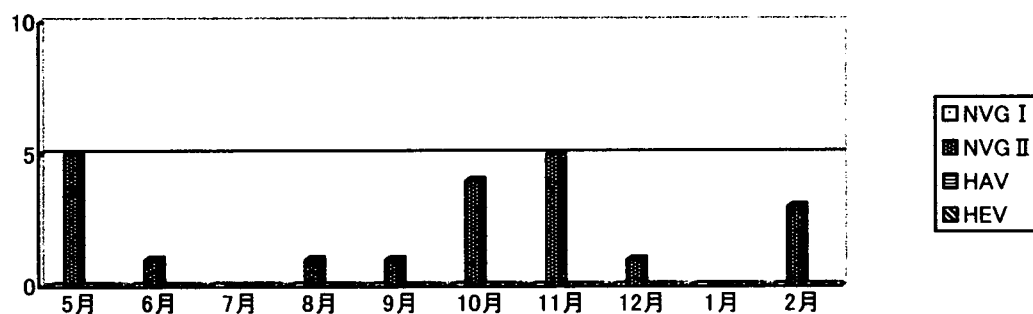


図1 月別ウイルス検出状況

表2 国別・種類別のウイルス検出状況

国名	種類	検査数	NV		HAV	HEV
			G I	G II		
韓国	アカガイ	93	0	18 (19.4%)	0	0
中国	アカガイ	24	0	2 (8.3%)	0	0
	ハマグリ	3	0	1 (33.3%)	0	0
計		120	0	21 (17.5%)	0	0