

ucts were analyzed by 2% agarose gel electrophoresis and visualized by ethidium bromide staining. Norovirus, Aichi virus, and HAV nucleotide sequences were prepared as previously described (11).

Sequence analysis. Norovirus, Aichi virus and HAV nucleotide sequences were prepared with the terminator cycle sequence kit (version 3.1, Applied Biosystems, Warrington, UK) and determined with the ABI 3130 sequencer (ABI, Boston, Mass.). In order to determine the norovirus genotypes in the packages with multiple genotypes, we cloned the reverse transcription PCR products into pCR2.1 (Invitrogen), and at least four clones from each sample were sequenced. The genetic diversity of the adenoviruses was not determined in this study. Norovirus nucleotide sequences were aligned with ClustalX, and the distances were calculated by Kimura's two-parameter method. The norovirus nucleotide sequence data determined in this study has been deposited in GenBank under accession no. EF424485 through EF424557.

RESULTS

Thirty-five (61%) of 57 packages were contaminated with one type of virus, 5 (9%) of 57 packages were contaminated with two different types of viruses, 16 (28%) of 57 packages were contaminated with three different types of viruses, and 5 (9%) of 57 packages were contaminated with at least four different types of viruses (Table 1). Astrovirus was not detected in any of the packages.

Noroviruses. Thirty-one (54%) of 57 packages were contaminated with noroviruses (Table 1). Norovirus GI and GII sequences were detected in 24 and 23 packages, respectively (Fig. 1). A total of 24 norovirus GI sequences were detected, and these clustered into nine different GI genotypes (Fig. 1), including one unpublished GI genotype (GI/1, GI/2, GI/4, GI/5, GI/8, GI/11, GI/12, GI/14, and GI/New). A total of 23 norovirus GII sequences were detected, and these clustered into eight different GII genotypes (Fig. 1), including one unpublished GII genotype (GII/2, GII/3, GII/4, GII/5, GII/6, GII/7, GII/9, and GII/New). More than half of the norovirus-positive packages, 20 (65%) of 31, contained two or more norovirus genotypes. Twenty-three (74%) of 31 norovirus-positive packages were co-contaminated with two or more other types of viruses (Table 1).

Aichi virus. We found that 19 (33%) of 57 packages were contaminated with Aichi viruses. The 19 Aichi virus sequences shared over 95% nucleotide homology, suggesting that the same strain contaminated the clams. These 19 sequences closely matched (approximately 95% nucleotide homology) genogroup A sequences found on the database (data not shown). All of the Aichi virus-positive packages were co-contaminated with other viruses (Table 1).

Rotavirus. Fourteen (42%) of 33 packages were contaminated with rotavirus (24 packages were unavailable for

screening). Six different rotavirus G types were detected, i.e., G1, G2, G3, G4, G8, and G9. Of the 14 rotavirus-positive packages nine (53%) contained two or more rotavirus G types (Table 1).

Adenovirus. Seventeen (52%) of 33 packages were contaminated with adenoviruses, using primers designed to detect the two enteric adenoviruses, i.e., Ad40 and Ad41. Fourteen (82%) of 17 adenovirus-positive packages were co-contaminated with other viruses (Table 1).

HAV and HEV. One (2%) of 57 packages was contaminated with HAV. Sequence analysis of the capsid gene indicated that it belonged to subtype IA. HEV was previously detected in 2 of 46 packages (17). An additional 11 packages were screened for HEV; however these were all negative (Table 1).

DISCUSSION

The current study has shown that Japanese clams (*C. japonica*) purchased in supermarkets and fish markets were highly contaminated with human enteric viruses from the natural environment. Similarly, a 3-year study in France found that mussel samples (*Mytilus galloprovincialis*) were highly contaminated with enteric viruses (15). However, an important difference between the study conducted in France and the current study was that the French mussels were collected in areas where sewage was discharged and were prohibited for human consumption, whereas the Japanese clams were sold in supermarkets and fish markets and were considered suitable for human consumption.

Noroviruses are the dominant cause of outbreaks of gastroenteritis worldwide. In this study, the noroviruses were the dominant virus detected the clam packages (found in 54% of the packages). In a comparative study, noroviruses were detected in only approximately 5 to 9% of Japanese oysters (*Crassostrea gigas* or *Crassostrea nippona*) (20, 21). These results suggested that the Japanese clams were more highly contaminated with noroviruses than were the Japanese oysters, or alternatively, it was just a reflection on the different collection sites, i.e., the clams were collected from brackish waters, whereas the oysters were collected from the sea. Alternatively, the different detection rates in clams and oysters were a result of the different sample preparations. Nevertheless, all of the norovirus sequences detected in the clam packages closely matched other sequences detected in patients with gastroenteritis in Japan (using GenBank BLAST searches), suggesting that the contaminated Japanese clams could cause gastroenteritis in humans, although direct evidence is lacking.

Over the past 10 years, the norovirus GII/4 strains have become the dominant cause of outbreaks of gastroenteritis

FIGURE 1. Phylogenetic analysis of norovirus capsid sequences (approximately 300 nucleotides) showing the different genogroups and genotypes. The numbers on each branch indicate the bootstrap values for the genotype. Bootstrap values of 950 or higher were considered statistically significant for the grouping. The scale represents nucleotide substitutions per site. The frequency of each norovirus genotype was 9, 1, 5, 1, 8, 5, 1, 2, 2, 1, 20, 8, 1, 1, 2, 1, and 4 for GI/1, GI/2, GI/4, GI/5, GI/8, GI/11, GI/12, GI/14, GI/New, GII/2, GII/3, GII/4, GII/5, GII/6, GII/7, GII/9, and GII/New, respectively.

worldwide. In a recent study, we also found that the GII/4 strains were the dominant cause of outbreaks of gastroenteritis in food-catering settings in Japan (22). In the current study, the norovirus GII/3 sequences were detected more frequently than were the norovirus GII/4 sequences, i.e., 20 versus 8 sequences, respectively (Fig. 1). This result may only reflect that the GII/3 strains were more dominant in this area of Japan; however, the norovirus GII/3 strains were the second most dominant cause of gastroenteritis in Japan, Australia, and Vietnam (2, 8, 22), indicating that this genotype is indeed a major cause of gastroenteritis. Noteworthy were two new norovirus genotypes (GI/New and GII/New; Fig. 1) detected in the clam packages, at three different sites, and several months apart. Similar norovirus sequences were recently reported in patients in Thailand, Taiwan, Hong Kong, and from an outbreak on a U.S. navy ship (data not shown), indicating that there may be a widespread distribution of these two newly identified genotypes.

We found that more than half (65%) of the norovirus-positive packages contained two or more norovirus genotypes (Table 1 and Fig. 1). Multiple norovirus genotypes have also been found in oyster-associated outbreaks of gastroenteritis (10), and in a recent study, we found multiple norovirus genotypes in outbreaks of gastroenteritis at various food-catering settings throughout Japan (22). These findings indicate that like oyster-associated outbreaks, clam-associated outbreaks may also be caused by multiple norovirus genotypes, although further studies are needed.

The Aichi virus was found in 33% of the clam packages, and all of these packages were co-contaminated with other viruses. The Aichi virus sequences detected in the packages closely matched other Aichi virus sequences (genogroup A) that were detected in patient stool specimens from oyster-associated gastroenteritis (26). To the best of our knowledge, these results have shown for the first time that the Aichi virus can also be accumulated in these Japanese clams. The importance of Aichi virus in human gastroenteritis is still poorly understood, and very few studies have reported Aichi virus infections since its first discovery in 1989 (25). One recent study detected Aichi virus in only 3% (28 of 912) of stool specimens from infants with sporadic cases of gastroenteritis (collected in Japan, Bangladesh, Thailand, and Vietnam), which were negative for rotavirus, adenovirus, norovirus, sapovirus, and astrovirus (23). Further studies are clearly needed in order to determine the importance of this virus in humans.

Rotavirus was detected in 14 of 33 available clam packages. A similar study in France found rotavirus in 52% of mussel samples and 27% of oyster samples (15). Rotavirus infections usually causes sporadic cases of gastroenteritis in children in the winter season, but our results suggest that rotavirus may persist longer in the environment, at least up to June (Table 1). A great genetic diversity of rotavirus G types was detected in the packages, and we also found that 9 of 17 rotavirus-positive packages contained two or more rotavirus G types. Likewise, a study in Egypt and Spain also found a great genetic diversity of rotavirus G types as well as unusual genotypes in sewage samples (24).

Enteric adenoviruses (Ad40 and Ad41) were detected in 17 of 33 available clam packages. Adenovirus infections in the western part of Japan were reported to be low, with one study reporting adenovirus serotype 41 in only approximately 3% of stool specimens from infants with sporadic cases of gastroenteritis (6). The high detection rate of adenoviruses in these packages may indicate that adenovirus prevalence is variable, although further studies are needed.

One (2%) of 57 packages was contaminated with HAV, and sequence analysis indicated that it belonged to subtype IA. The low detection rate of HAV was also observed in an oyster study that found only 2 of 112 samples positive in Japan (12). The low detection rate of HAV in the clams and oysters was not unusual, because the prevalence of HAV infections is low in Japan, although this may be increasing (13). More surveillance is clearly needed in order to locate other contaminated areas and help control the spread of HAV contamination.

Astroviruses were not detected in any of the Japanese clam packages. This result is surprising because astroviruses were detected in more than half (61%) of African clam samples (5), 50% of French mussel samples (15), and 17% of French oyster samples (15). This result suggested that the astrovirus may not concentrate to detectable levels in certain species of shellfish or the level of contamination differs in each place, which was similarly observed in two other studies (3, 21).

In conclusion, this study has shown that the Japanese clams were highly contaminated with many types of human enteric viruses capable of causing gastroenteritis and/or acute viral hepatitis. At present, the Enforcement Regulation of Food Sanitation Law mainly focuses on bacterial contamination in Japan (21). Clearly, regulations and standards need to be revised in order to address this problem of viral contamination in the Japanese clams. The health risks associated with eating contaminated oysters have been well documented, but further studies are clearly needed in order to determine the health risks associated with eating these contaminated Japanese clams.

ACKNOWLEDGMENT

This work was supported in part by a grant for Research on Emerging and Reemerging Infectious Diseases, Research on Food Safety from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan.

REFERENCES

1. Allard, A., B. Albinsson, and G. Wadell. 1992. Detection of adenoviruses in stools from healthy persons and patients with diarrhea by two-step polymerase chain reaction. *J. Med. Virol.* 37:149-157.
2. Bull, R. A., E. T. Tu, C. J. McIver, W. D. Rawlinson, and P. A. White. 2006. Emergence of a new norovirus genotype II.4 variant associated with global outbreaks of gastroenteritis. *J. Clin. Microbiol.* 44:327-333.
3. Costantini, V., F. Loisy, L. Joens, F. S. Le Guyader, and L. J. Saif. 2006. Human and animal enteric caliciviruses in oysters from different coastal regions of the United States. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:1800-1809.
4. Di Pinto, A., M. C. Conversano, V. T. Forte, G. La Salandra, C. Montervino, and G. M. Tantillo. 2004. A comparison of RT-PCR-based assays for the detection of HAV from shellfish. *New Microbiol.* 27:119-124.
5. Elamri, D. E., M. Aouni, S. Parnaudeau, and F. S. Le Guyader. 2006.

- Detection of human enteric viruses in shellfish collected in Tunisia. *Let. Appl. Microbiol.* 43:399–404.
6. Fukuda, S., M. Kuwayama, S. Takao, Y. Shimazu, and K. Miyazaki. 2006. 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.
 7. Gouvea, V., R. I. Glass, P. Woods, K. Taniguchi, H. F. Clark, B. Forrester, and Z. Y. Fang. 1990. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* 28:276–282.
 8. Hansman, G. S., L. T. Doan, T. A. Kuyen, S. Okitsu, K. Katayama, S. Ogawa, K. Natori, N. Takeda, Y. Kato, O. Nishio, M. Noda, and H. Ushijima. 2004. Detection of norovirus and sapovirus infection among children with gastroenteritis in Ho Chi Minh City, Vietnam. *Arch. Virol.* 149:1673–1688.
 9. Hansman, G. S., T. Oka, R. Okamoto, T. Nishida, S. Toda, M. Noda, D. Sano, Y. Ueki, T. Imai, T. Omura, O. Nishio, H. Kimura, and N. Takeda. 2007. Human sapovirus in clams, Japan. *Emerg. Infect. Dis.* 13:620–622.
 10. Kageyama, T., M. Shinohara, K. Uchida, S. Fukushi, F. B. Hoshino, S. Kojima, R. Takai, T. Oka, N. Takeda, and K. Katayama. 2004. Coexistence of multiple genotypes, including newly identified genotypes, in outbreaks of gastroenteritis due to Norovirus in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 42:2988–2995.
 11. Katayama, K., H. Shirato-Horikoshi, S. Kojima, T. Kageyama, T. Oka, F. Hoshino, S. Fukushi, M. Shinohara, K. Uchida, Y. Suzuki, T. Gojobori, and N. Takeda. 2002. Phylogenetic analysis of the complete genome of 18 Norwalk-like viruses. *Virology* 299:225–239.
 12. Kitahashi, T., T. Tanaka, and E. Utagawa. 1999. Detection of HAV, SRSV and astrovirus genomes from native oysters in Chiba City, Japan. *Kansenshogaku Zasshi* 73:559–564.
 13. Kiyohara, T., T. Sato, A. Totsuka, T. Miyamura, T. Ito, and T. Yoneyama. 2007. Shifting seroepidemiology of hepatitis A in Japan, 1973–2003. *Microbiol. Immunol.* 51:185–191.
 14. Kojima, S., T. Kageyama, S. Fukushi, F. B. Hoshino, M. Shinohara, K. Uchida, K. Natori, N. Takeda, and K. Katayama. 2002. Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *J. Virol. Methods* 100:107–114.
 15. Le Guyader, F., L. Haugarreau, L. Miossec, E. Dubois, and M. Pommpuy. 2000. Three-year study to assess human enteric viruses in shellfish. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:3241–3248.
 16. Le Guyader, F., F. H. Neill, M. K. Estes, S. S. Monroe, T. Ando, and R. L. Atmar. 1996. Detection and analysis of a small round-structured virus strain in oysters implicated in an outbreak of acute gastroenteritis. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:4268–4272.
 17. Li, T. C., T. Miyamura, and N. Takeda. 2007. Detection of hepatitis E virus RNA from the bivalve Yamato-Shijimi (*Corbicula japonica*) in Japan. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 76:170–172.
 18. Matsui, M., H. Ushijima, M. Hachiya, J. Kakizawa, L. Wen, M. Oseto, K. Morooka, and J. Kurtz. 1998. Determination of serotypes of astroviruses by reverse transcription-polymerase chain reaction and homologies of the types by the sequencing of Japanese isolates. *Microbiol. Immunol.* 42:539–547.
 19. Murray, C. J., and A. D. Lopez. 1996. Evidence-based health policy—lessons from the Global Burden of Disease Study. *Science* 274:740–743.
 20. Nishida, T., H. Kimura, M. Saitoh, M. Shinohara, M. Kato, S. Fukuda, T. Munemura, T. Mikami, A. Kawamoto, M. Akiyama, Y. Kato, K. Nishi, K. Kozawa, and O. Nishio. 2003. Detection, quantitation, and phylogenetic analysis of noroviruses in Japanese oysters. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:5782–5786.
 21. Nishida, T., O. Nishio, M. Kato, T. Chuma, H. Kato, H. Iwata, and H. Kimura. 2007. Genotyping and quantitation of noroviruses in oysters from two distinct sea areas in Japan. *Microbiol. Immunol.* 51:177–184.
 22. Ozawa, K., T. Oka, N. Takeda, and G. S. Hansman. 2007. Norovirus infections in symptomatic and asymptomatic food-handlers in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 45:3996–4005.
 23. Pham, N. T., P. Khamrin, T. A. Nguyen, D. S. Kanti, T. G. Phan, S. Okitsu, and H. Ushijima. 2007. Isolation and molecular characterization of Aichi viruses from fecal specimens collected in Japan, Bangladesh, Thailand, and Vietnam. *J. Clin. Microbiol.* 45:2287–2288.
 24. Villena, C., W. M. El-Senousy, F. X. Abad, R. M. Pinto, and A. Bosch. 2003. Group A rotavirus in sewage samples from Barcelona and Cairo: emergence of unusual genotypes. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:3919–3923.
 25. Yamashita, T., S. Kobayashi, K. Sakae, S. Nakata, S. Chiba, Y. Ishihara, and S. Isomura. 1991. Isolation of cytopathic small round viruses with BS-C-1 cells from patients with gastroenteritis. *J. Infect. Dis.* 164:954–957.
 26. Yamashita, T., M. Sugiyama, H. Tsuzuki, K. Sakae, Y. Suzuki, and Y. Miyazaki. 2000. Application of a reverse transcription-PCR for identification and differentiation of Aichi virus, a new member of the picornavirus family associated with gastroenteritis in humans. *J. Clin. Microbiol.* 38:2955–2961.

パンに含まれるノロウイルスの回収法の検討

¹ 独立行政法人日本スポーツ振興センター, ² 国立感染症研究所感染症情報センター,³ 国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部有田 知子^{1,2} 木村 博一² 野田 衛³ 西尾 治³

(平成 20 年 6 月 9 日受付)

(平成 20 年 8 月 15 日受理)

Key words: norovirus, bread

序 文

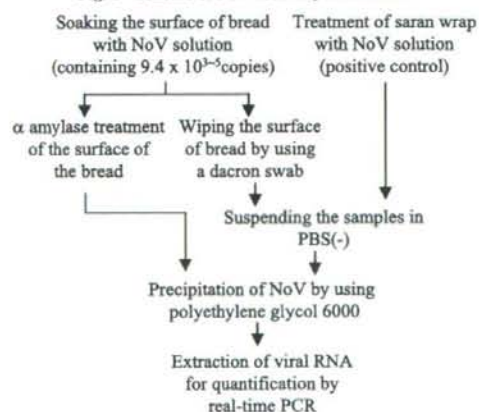
二枚貝以外の食品が原因であると推定されるノロウイルス (NoV) による食中毒事件が急増しているが、これらの食品からのウイルス検出報告は少ない。特に学校給食における食中毒事件では、疫学的に原因食がパンと推定される事例が少なからずあるものの、パン自体から NoV を検出した事例は稀である。この原因の一つとして、パンから NoV を効率的に回収する方法が確立されていないことが挙げられる。実際、パンからウイルスを回収する場合、他の食品の場合と比べウイルスの回収率が極めて低いことが指摘されている¹⁾。本研究では、学校給食で提供される機会が最も多いコッペパンを α アミラーゼで消化することで、付着している NoV を効率良く回収する実験系を検討し、若干の知見を得たので以下に報告する。

材料および方法

NoV (genogroup II) は、患者便 10% 乳剤からシヨ糖密度勾配法にて精製し、PBS (-) に浮遊させた。精製して得た 9.4×10^5 コピー/100 μ L および同液から希釈して得た理論上 9.4×10^4 コピー/100 μ L、 9.4×10^3 コピー/100 μ L の濃度の genogroup II の NoV 浮遊液をコッペパン 12.5g の表面に 100 μ L 塗布し、30 分間室温に放置後さらに 4 $^{\circ}$ C で一夜放置した。パン表面を 3g 採取し、PBS (-) で 10% 乳剤を作成し、 α アミラーゼ (Wako) 溶液を 0mg/mL、5mg/mL、10mg/mL および 30mg/mL の濃度になるよう添加し、室温で 30 分間振とう後 4 $^{\circ}$ C で一晩静置した (Fig. 1)。 α アミラーゼで処理した乳剤を 9,100 \times g で 4 $^{\circ}$ C 20 分間遠心し、野田らの方法²⁾により、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 $^{\circ}$ C で一晩静置し、9,100 \times g で 4 $^{\circ}$ C 20 分間遠心した。沈渣を 140 μ L の doubly distilled water に再懸濁し、QIAamp viral RNA mini kit (QIAGEN) を用いて RNA を抽出し、1 単位の DNase I (Takara) による 37 $^{\circ}$ C 30 分間の処理後、ランダムヘキサマー (Promega) を用いて SuperScriptII (Invitrogen) により cDNA を作成し、COG2F、COG2R プライマーおよび RING2-TPTaqMan プロンプを用いた Kagayama らによる方法³⁾によるリアルタイム PCR 法でウイルスゲノムの定量を行った。厚生労働省通知平成 15 年 11 月 5 日食安監発第 1105001 号に基づき、実測値で 10 コピー (希釈率を補正した換算値で 400 コピーに相当) を検出限界とした。対照として、25cm² のサランラップに塗布した NoV の PBS (-) による回収試験も行った (Fig. 1)。また、 α アミラーゼ処理によるウイルスの抽出・回収以外の方法として、ダクロン綿棒を用いたパン表面のふき取りによるウイルスの回

Fig. 1 Scheme of NoV recovery from bread



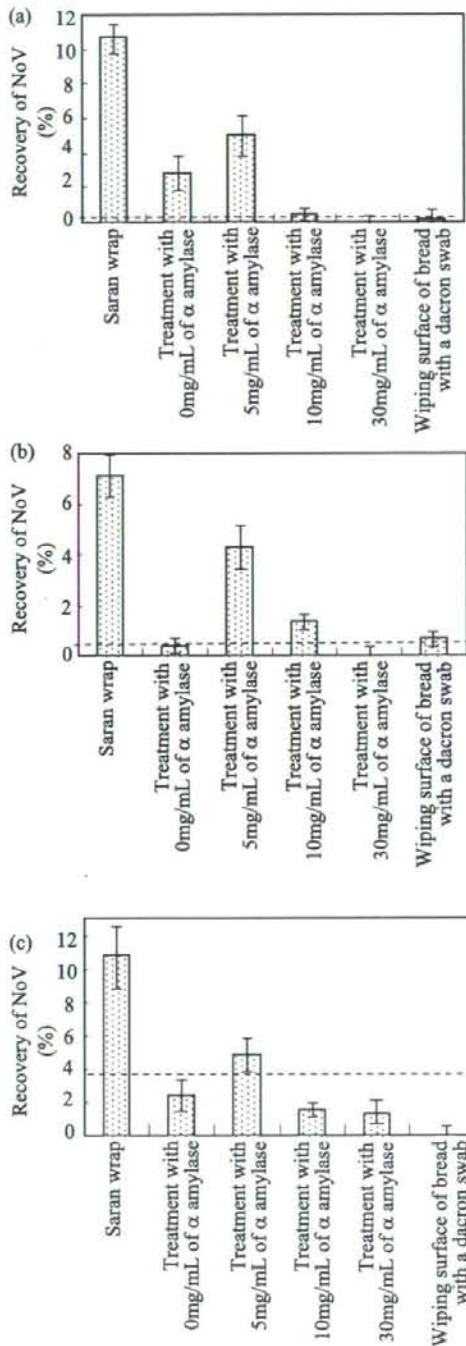
別刷請求先: (〒208-0011) 東京都武蔵村山市学園 4-7-1

国立感染症研究所感染症情報センター 第六室

有田 知子

Fig. 2 Efficiency of NoV recovery (n=6)

Efficiency of NoV recovery from bread soaked with NoV solution containing (a) 9.4×10^5 copies, (b) 9.4×10^4 copies, and (c) 9.4×10^3 copies of NoV genome is shown with standard error. Dotted line: limit of detection.



取を試みた (Fig. 1).

成績

NoV 回収試験の成績を Fig. 2 に示した。サララップからの回収率は 10% 前後であった。パンへの NoV の添加量にかかわらず、 α アミラーゼ処理は 5mg/mL の濃度の時に回収率が 5% 前後と最大になり、ダクロン綿棒を用いた回収法よりも高い回収率を得た。

考察

今回の実験においては、パンを処理する際の α アミラーゼの至適濃度は 5mg/mL であり、それ以上の濃度で添加した場合には NoV の回収率が低下した。高濃度のアミラーゼで処理を行ったサンプルでは、遠心操作によって上清と沈殿を完全に分離できなかった。そのため、回収した上清中に混入した沈殿物由来成分が、その後の NoV 回収行程を阻害した可能性がある。

森らはネコカリシウイルスを用いたパンからの添加回収試験で、従来法で 0.1% 以下、界面活性剤を用いた方法で 0.5% の回収率であったと報告している¹⁾。一方、今回の実験では、 α アミラーゼ処理をパンに行うことにより、5% 前後の NoV 回収が可能になった。多くの NoV 食中毒患者からは、便 1g 当たりゲノム数に換算して、 10^4 から 10^6 コピーに相当する多量のウイルスが排泄されると考えられている²⁾。また、NoV の感染力は強く、100 粒子以下のウイルス量で感染が成立すると考えられている³⁾。このため、NoV は極めて微量の便の食品汚染でも食中毒を発生しうることを我々は指摘している⁴⁾。理論上、本法を用いることで、仮に 1g 中 10^4 コピーの NoV ゲノムを含む便が食品取扱者の手からパンに 0.1mg 付着した場合でも (パン全体に 10^4 粒子の NoV が付着した場合)、NoV の検出が可能であると考えられる。しかし、回収率が 5% 程度であるので、さらなる回収法の改善が必要であると思われる。

文献

- 1) 森 功次, 林 志直, 白澤 浩, 秋場哲哉, 野口やよい, 水野美由紀, 他: 食品からのウイルス回収における界面活性剤添加の効果. 第 28 回日本食品微生物学会学術総会. 2007; p. 51.
- 2) 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). 日本ウイルス学会第 55 回学術集会. 2007; p. 161.
- 3) Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, *et al.*: Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 1548-57.
- 4) 西尾 治, 秋山美穂, 愛木智香子, 杉枝正明, 福田伸治, 西田知子, 他: ノロウイルスによる食

- 中毒について, 食衛誌 2005: 46 (6): 235-45.
5) Centers for Disease Control and Prevention: "Norwalk-like viruses." Public health consequences and outbreak management. MMWR 2001: 50: 1-18.

A Study of Recovery of Norovirus from Bread

Tomoko ARITA^{1,2}, Hirokazu KIMURA², Mamoru NODA³ & Osamu NISHIO³

¹National Agency for Advancement of Sports and Health, ²Infectious Disease Surveillance Center, National Institute of Infectious Diseases, ³Division of Biomedical Food Research, National Institute of Health Sciences

[J.J.A. Inf. D. 82: 473~475, 2008]

臨床と微生物
Vol.35 増刊号 別刷
2008年10月31日
株式会社近代出版

微生物について

ウイルス性食中毒の検査

NODA MAMORU

野田 衛

◎国立医薬品食品衛生研究所

要旨 ウイルスは食品を介さないヒト-ヒト感染や、ヒト-環境-ヒト感染を引き起こすため、食中毒の調査には、その可能性を排除し、食中毒と断定するに足る疫学的根拠が求められる。そのため、ウイルス性食中毒の検査は、患者および関連性が疑われる食材や施設の調理従事者等からPCR法、リアルタイムPCR法によりウイルスの検出を行うとともに、検出ウイルスの異同性をシーケンスなどの遺伝子解析により確認することを基本とする。

はじめに

ウイルス性食中毒の原因として最も重要なウイルスはノロウイルスであり、近年の原因物質別の食中毒発症件数をみると、事例数で第2位（2006年は第1位）、患者数で第1位を占めている。その他のウイルスとしては、サボウイルス、A群およびC群ロタウイルス、アストロウイルスなどが原因となる。本稿では、ノロウイルスを中心としたウイルス性食中毒の検査法について概説するが、集団発生を感知した場合、食中毒か感染症かの区別が困難な場合が少なくないため、胃腸炎集団発生を起こすウイルス全般を対象とした。なお、潜伏期間が長く、一般に患者の医療機関の受診・検査により発見されるA型肝炎、E型肝炎は汚染源の特定などの食中毒検査が事実上困難であることから、取り扱わないこととした。

1 ウイルス性食中毒の特徴

ウイルスは細菌とは異なり食品や環境中で増殖することはない。臨床症状は、嘔吐、嘔気、下痢、腹痛、発熱などが主体で、潜伏期間はおおむね

24～48時間である。ウイルス性食中毒は主に感染した調理従事者等が糞便や嘔吐物に含まれるウイルスを手指等を介し直接的・間接的に食品や水を汚染させることにより発生する。下水等によるウイルスを蓄積したカキ等の二枚貝も原因になる。主に冬季に発生するが、近年はほぼ一年中発生がみられ、季節性が低下している。不顕性感染もみられる。

ノロウイルスは10～100個程度のウイルス粒子の摂取により感染が成立し、症状が治まった後も1週間～1カ月程度糞便中にウイルス粒子が排出される。ノロウイルスの種類により宿主の感受性（ウイルスが感染できるか）が異なり、この感受性の違いに組織・血液型抗原が関与すると考えられている¹⁾。近年全世界的に流行している遺伝子型GII.4のノロウイルスはウイルス構造蛋白(カプシッド)が変化しやすく、それに伴い抗原性や組織・血液型抗原との結合性が変化していることが報告された²⁾。

2 ウイルス性食中毒の検査の進め方

ウイルス性食中毒が疑われたら、まず、原因ウイルスを特定するために患者由来の糞便等についてウイルスの検出検査を行う。患者から有意なウイルスが検出されたら、汚染源や汚染経路の追及のために疫学調査等から関連性が推定される施設の調理従事者等の糞便や食品等について、ウイルスの検出を試みる。患者、調理従事者等、食品等から検出されたウイルスについてシーケンス解析等により異同性を調べ、それらの関連性における科学的根拠を深める。以下、主にノロウイルスについて述べるが、他のウイルスについてもほぼ同様である。

3 検体の採取と処理

●ヒト由来検体

患者には検査の目的が食中毒の原因究明であることを説明し、時間的、空間的な隔たりを考慮し、異なるグループごとに採取するなど、疫学的に重要な患者を中心に検体の提供を受ける。急性期の糞便が最も有用な検査材料である。嘔吐物は液体成分（胃液や腸液を含む）の採取を心がける。高齢者など口腔内ケアが不十分な患者では、嘔吐後の口腔うがい液からもノロウイルスの検出が可能である¹⁾。

近年のノロウイルスによる食中毒は調理従事者等からの食品汚染を原因とする事例が多くを占め、汚染源の特定には調理従事者等からのノロウイルス検出が重要になる。ノロウイルスによる食中毒が疑われたら、当該施設の調理従事者等に速やかに検便を依頼し、必要に応じ検査を進める。

●食品、水、環境由来検体

食品からのウイルスの検出は、カキ等の二枚貝を除き十分には確立されていない。カキの検査は厚生労働省のマニュアル²⁾に従うが、中腸腺を切り出した後、PCR検査の阻害となる白色のグリコーゲンをアミラーゼで消化することにより検出

率、定量値、特異性が向上する³⁾。その際、ポリエチレングリコール沈殿は、12%ポリエチレングリコール 6000、1M NaCl の条件で行うとよい⁴⁾。

二枚貝以外の食品からのノロウイルスの検出例は少ない。これは、食品中ではノロウイルスは増殖せず汚染量は必ずしも多くない、極少量のウイルス粒子の摂取で感染が成立する、食品からの効率的な濃縮方法が確立されていないことなどが大きな理由である。したがって、食品をやみくもに検査してもノロウイルスを検出することは難しく、食品の形態や想定される汚染部位に応じた検体処理を行う必要がある。表面汚染が推定される場合は食品を乳剤化せず、表面から洗い流すようにウイルスを回収する⁵⁾。その際、回収液に Tween20 や SDS などの界面活性剤を加えると回収率が高まる場合がある⁶⁾。各ウイルスに対する特異抗体を保有している場合は、磁気ビーズを利用した免疫学的濃縮法が有用である⁷⁾。最近、磁気ビーズに替わり、プロテイン A（黄色ブドウ球菌細胞壁由来 IgG 抗体結合性蛋白質）を用いた免疫学的濃縮法が報告された⁸⁾。いずれにしても、食品検査を実施する場合は、患者等由来のウイルスの汚染防止に注意し、汚染部位等を考慮したきめ細かな検査が重要である。

ウイルス汚染が疑われる飲料水などの水材料は、陰電荷膜⁹⁾、限外濾過¹⁰⁾などで濃縮し、検査に供する。また、汚染経路推定のためには、調理施設などの環境材料の拭き取りも検査の対象となる。その場合も Tween20 などの界面活性剤を加えた PBS を使用すると回収率が高くなる¹¹⁾。

4 検査法選択の基本的な考え方

ノロウイルスの検査法は PCR 法、リアルタイム PCR 法の併用を原則とする（表 1、表 2）。その理由は、それらが現在最も信頼性の高い検査法であることに加え、PCR 法は増幅産物のシーケンス解析により検出ウイルスの遺伝子的な異同の比較ができる。リアルタイム PCR 法は迅速・高感度であるとともにウイルス（遺伝子）を定量

表1 ウイルス性食中毒のPCR検査に使用するPCR増幅系

ウイルス	PCR増幅系	文献
ノロウイルス	カプシッド領域(GI) COG1F/G1-SKR ⇒ ^{*)} G1-SKF/G1-SKR	4
	カプシッド領域(GII) COG2F/G2-SKR ⇒ G2-SKF/G2-SKR	4
	ALPF/G2AL-SKR ⇒ G2-SKF/G2AL-SKR	4
	ポリメラーゼ領域 MR3/MR4 ⇒ Yuri22F/R	4
	36/35' ⇒ NV82SM82/NV81	4
リアルタイムPCR(GI)	P1/P3 ⇒ P1/P2/Y1/Y2	4
	リアルタイムPCR(GII) COG1F/COG1R[RING1-TP(a):RING1-TP(b)]	4
	COG2F/ALPF/COG2R[RING2AL-TP]	4
サボウイルス	SV-F11/SV-R11 ^{*)} ⇒ SV-F21 ^{*)} /SV-R2	11
	SV-F13/SV-F14/SV-R13/SV-R14 ⇒ SV-F22/SV-R2	12
アストロウイルス	AC4/AC6	14
	AC1'/AC230	14
アイチウイルス	C(+)/C(-) ⇒ C94b/264K	11
	10f/10r	15
A群ロタウイルス	Beg9/End9 ⇒ aAT8aBT1aCT2aDT4aET3aFT9/RVG9	11
C群ロタウイルス	G8S/G8A ⇒ G8NS1/G8NA2	16
アデノウイルス	Hex3/Hex4	17
	AdTU7/AdTU4' ⇒ AdnU-S'/AdnU-A	18

*): ノロウイルスのPCR増幅系は代表的なプライマーの代表的な組み合わせのみを示した

*): ⇒の左側のプライマー組で1st PCRを行い、右側のプライマー組でnested PCRが可能

*): SV-R1の替りにSV-R11を、SV-F2の替わりにSV-F21を使用する(千葉県衛生研究所 岡田峰幸先生私信)

的に検出することができるなど、感染源特定に役立つ情報が得られるためである。ロタウイルス、アデノウイルスを除いた他のウイルスも同様にPCR法を基本とし、ランダムプライマーでcDNA合成しておけば迅速に結果を得ることができる。

ノロウイルスを含め多くの下痢症起因ウイルスは1本鎖RNAウイルスであり、遺伝子的に変化しやすく、遺伝子検査や抗原検査では検出されない場合がある。また、今後検出できない新型・変異型のウイルスの出現の可能性もあり、電子顕微鏡検査ではそれらも含め一様に検出することができる。特に、遺伝子検査でウイルスが検出されない場合は、積極的に電子顕微鏡検査を導入する。

現在、ノロウイルス検出には多くの検査キットが市販されているが、これらは食中毒検査では補助的な手段として位置付けることが肝要である。特に、キット自体の検出感度に加え、必ずしもす

べてのノロウイルスを検出できるとは限らず、検出感度はノロウイルスの種類により異なる場合があることを理解しておく。キットの測定原理や特性を把握した上で、患者便の迅速スクリーニング検査などに利用する。

5 各ウイルスの検査法

●ノロウイルス

ノロウイルスのPCR法は種々の増幅系があるが、G1(2)-SKF/G1(2)-SFRまたはCOG1(2)F/G1(2)-SKRによるシングルPCR(主に糞便)、あるいはそれらを組み合わせたnested PCR(主に食品)など、カプシッド領域上流を標的とする増幅系が広く利用されている¹⁾。しかし、それらのプライマーでも検出できない場合があり、ポリメラーゼ領域等他の増幅系を数種類併用することが望ましい。リアルタイムPCR法¹⁾は糞便と食品に適用することができる。食品からの検出の場合、

表2 各プライマーの塩基配列*

プライマー名	塩基配列	極性	大きさ(bp)	文献
サボウイルス				
SV-F13	5'-GAYYWGGCYCTCGCYACCTAC-3'	+	約 800	12
SV-F14	5'-GAACAAGCTGTGGCATGCTAC-3'	+		12
SV-R13	5'-GGTGANAYNCCATTKTCCAT-3'	-		12
SV-R14	5'-GGTGAGMMYCCATTCTCCAT-3'	-		12
SV-F22	5'-SMWAWTAGTGTGTGARATG-3'	+	約 420	12
SV-R2	5'-GWGGGRTCAACMCCWGGTGG-3'	-		12
SV-R11**	5'-CWGGTGAMACMCCATTKTCCAT-3'	-		
SV-F21**	5'-ANTAGTGTGTGARATGGAGGG-3'	+		
アストロウイルス				
AC4	5'-GACGAAGCGGACAGTTTGA-3'	+	380	14
AC6	5'-GCTTCTGATTAATCAATTTAAA-3'	-		14
AC1'	5'-ATGGCTAGCAAGTCTGACAAG-3'	+	230	14
AC230	5'-GGTTTGGTCTGTGACACC-3'	-		14
アイチウイルス				
10f	5'-GATGCTCCTCGGTGGTCTCA-3'	+	631	15
10r	5'-GTCGGGTCCATCACAGGGT-3'	-		15
C群ロタウイルス				
G8S	5'-GGCATTTAAAAAAGAAGAAGCTGT-3'	+	1,063	16
G8A	5'-AGCCACATGATCTTGTTTACGC-3'	-		16
G8NS1	5'-ATTATGCACAGACTATCGCCAC-3'	+	351	16
G8NA2	5'-GTTTCTGTACTAGCTGGTGAAC-3'	-		16
アデノウイルス				
Hex3	5'-GACATGACTTTTCGAGGTCCGATCCCATGGA-3'	+	139	17
Hex4	5'-CCGGCTGAGAAGGGTGTGCGCAGGTA-3'	-		17

*1: 厚生労働省ホームページ(<http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/kanren/kanshi/031105-1.html>)および国立感染症研究所ホームページ(<http://www.nih.go.jp/niid/reference/index.html>)からダウンロードできる「ノロウイルスの検出法」(文献4)「ウイルス性下痢症検査マニュアル(第3版)」(文献11)、「病原体検査マニュアル」(文献18)に掲載されているプライマーは省略した

*2: 岡田峰幸(千葉県衛生研究所)未発表データ

COG1(2)F/G1(2)-SFR 増幅産物を鋳型としてリアルタイム PCR を行う nested リアルタイム PCR も高感度で有用である¹⁰⁾。

●サボウイルス

サボウイルスの PCR 法は、ウイルス性下痢症検査マニュアル¹¹⁾に記載された方法および SV-F13/F14/SV-R13/R14→SV-F22/SV-R2¹²⁾の2種類の nested PCR 系が有用であり、いずれもカプシド蛋白コード領域上流付近を増幅する。前者は G1, G2 の増幅効率が高い一方、G4, G5 はやや検出されにくく、nested PCR を行うと糞便中

にアストロウイルス1型が多数存在すると非特異増幅が起こる場合がある。後者は G1, G2, G4, G5 を幅広く検出できるが、増幅効率は前者より若干低い傾向にある。また、文献11)に記載されているプライマーのうち SV-R1 を SV-R11 に、SV-F2 を SV-F21 に変更する方が、よい結果が得られる。リアルタイム PCR 法も報告されている¹³⁾が、試薬類や反応条件は文献に厳密に従うことが重要である。

●アストロウイルス

アストロウイルスの PCR 法は、Sakon ら¹¹⁾の

報告したプライマーが有用である。AC4/AC6は4型が検出できない欠点があるものの、シーケンス解析により遺伝子型別が可能である。一方、AC1/AC230は1~7型を検出できるが、増幅部位のホモロジーが高く遺伝子型別には不向きである。

●アイチウイルス

アイチウイルスのPCR法はウイルス性下痢症検査マニュアル¹¹⁾に記載された方法〔C(+)/C(-), C94b/264K〕で行う。遺伝子型別も可能で、nested PCR法を行うと感度が上がる。Yamashitaら¹²⁾の報告した10E/10Rはアイチウイルスを含み、広くコブウイルス属のウイルスを検出することが可能である。

●A群およびC群ロタウイルス

A群ロタウイルスはELISA法、イムノクロマト法、ラテックス凝集法などの迅速検査キットが種々のメーカーから市販されている。C群ロタウイルスも葛谷らが開発した逆受身赤血球凝集反応に基づく検査キット(試験研究用)で迅速検査が可能である。分子疫学的解析を目的としたPCR法ではA群ロタウイルスはウイルス性下痢症検査マニュアル¹¹⁾(Beg9/End9, aAT8:aBT1:aCT2:aDT4:aET3:aFT9/RVG9)。C群ロタウイルスは葛谷らの報告したプライマー¹⁰⁾(G8S/G8A, G8NS1/G8NA2)を用いる。

●アデノウイルス

アデノウイルスは、ウイルス分離、抗原検出法(ELISA法、イムノクロマト法、ラテックス凝集法)、PCR法などさまざまな検査法がある。PCR法で臨床検体からアデノウイルスを検出する場合はEchavarríaらの報告¹⁷⁾したプライマー(Hex3-Hex4)を用い、同定困難なアデノウイルスが分離された場合は病原体検査マニュアル¹⁵⁾記載のプライマー(AdTU7-AdTU4', AdnU-S', AdnU-A)でPCRを行い、シーケンス解析することで血

清型推定が可能である。

6 ノロウイルスの遺伝子学的異同性の比較

検出ノロウイルスの異同性を調べる最も有用な方法は、シーケンスによる塩基配列の比較である。通常はPCR増幅産物を精製したものを鋳型として、ダイレクトシーケンス法で実施する。カキなどの二枚貝が関連する事例では複数のウイルスに由来する遺伝子が増幅されることが少なくない。その場合はTAクローニング法によりクローニングを行い、単離されたDNAについてシーケンスを行う。進化系統樹解析は片山らが報告(http://idsc.nih.gov/idwr/kansen/k04/k04_11/kansen04.gif)した参照株を用いて実施する。リコンビナントタイプのウイルスの確認やヨーロッパの検出株との比較を行うためにはポリメラーゼ領域の解析を行う。ポリメラーゼ領域の上流域のプライマーとカプシッド領域の下流域のプライマーを用いることにより、ポリメラーゼ領域からカプシッド領域(上流)にかけてlong PCRを行うことができる。より詳細な検出株間の比較には、カプシッド蛋白の変異に富むP2ドメインを含むORF2全領域についてシーケンスを行う¹⁶⁾。

その他の遺伝学的な異同性を比較する解析手法としてSSCP法がある²⁰⁾。SSCP法は遺伝子型の特異性は通常困難であるが、検出ウイルスについてPCR産物の塩基配列が完全に一致するかどうかを比較的簡便に判別することができる。

7 シーケンス解析の意義と限界

平成19年10月12日付けで厚生労働省から都道府県知事等宛に通知された「ノロウイルス食中毒対策について」(食安発第1012001号)では、調理従事者からの食品汚染を原因とする食中毒と判断する場合には、いくつかの疫学的要件に加え「患者と調理従事者等から検出されたウイルスの遺伝子型が同一であること」を確認することが求められるなど、行政判断時においても遺伝子解析が必要となっている。シーケンス解析は、疫学

調査に基づく疫学的根拠を科学的に裏付け、かつ補完する有用なデータを提供するが、以下のように注意すべき点がいくつかあり、結果の持つ意義および限界などを十分に理解しておくことが肝要である。

- ①検出ウイルスの異同は汚染源の異同とは必ずしも一致せず、検出ウイルスが同じ場合に汚染源が同じ、逆に検出ウイルスが異なる場合に汚染源が異なると必ずしもいえない。前者の例として、特定のノロウイルスが市中で流行している場合は疫学的な関連性がなくても同じウイルスが検出されることがあり、後者の例として、カキなどの二枚貝による食中毒事例では、二枚貝と患者あるいは患者間で異なるウイルスが検出されるなど、同一事例で複数の異なるノロウイルスが検出されることが挙げられる。
- ②調理従事者等が被害者の場合（食材を食した場合など）は、患者と同じノロウイルスが検出されても、調理従事者等が汚染源とはならない。
- ③塩基配列の比較は通常全遺伝子の5%程度以下が解析されるに過ぎないため、解析部位に違いがなくても同じウイルスであるとは必ずしもいえない。
- ④二枚貝は複数の異なるノロウイルスを蓄積するため、PCR法で増幅され塩基配列が決定された株以外のノロウイルスが存在する可能性がある。
- ⑤遺伝子型とは遺伝子的に類似した株の集合であり、同じ遺伝子型の株は必ずしも遺伝学的に同一であることを示すものではない。特に近年流行している遺伝子型GII.4のノロウイルスは種々の亜型が存在している。

結 語

以上、最近の検査法に関する知見や行政的動向を踏まえ、ウイルス性食中毒の検査について概説した。本稿に記載された内容をすべて実施した場合、多くの人員、費用、時間を必要とし、日々発生する食中毒、有症苦情、集団感染症に対応することは困難であると筆者は考える。限られた資源

の中で、精度の高い検査を実施するためには、各自治体の実情に応じた調査・検査体制の再構築および検査担当者、食品衛生監視員等の高度な専門的知識・技術の維持、向上、継承が必須である。

謝 辞

本稿をまとめるにあたり、各種ウイルスの検査法に関し貴重なご助言をいただきました国立感染症研究所 藤本嗣人先生、岡智一郎先生、愛媛県立衛生環境研究所 山下育孝先生、千葉県衛生研究所 岡田峰幸先生、大阪府立公衆衛生研究所 左近直美先生、千葉市環境保健研究所 横井一先生、愛知県衛生研究所 山下照夫先生、岡山県環境保健センター 葛谷光隆先生、山口県環境保健センター 岡本玲子先生に感謝いたします。なお、文献4、11、18に記載されたプライマーについては、紙面の関係で元の文献の引用を控えさせていただきます。

- 1) Tan M, Jiang X: Norovirus and its histo-blood group antigen receptors: an answer to a historical puzzle. *Trends Microbiol* 13: 285-293, 2005.
- 2) Lindesmith LC, Donaldson EF, LoBue AD *et al.*: Mechanisms of GII.4 norovirus persistence in human populations. *PLoS Medicine* 5: 269-289, 2008.
- 3) 武田直和: 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）「食品中のウイルスの制御に関する研究」平成19年度総括・分担研究報告書, 2008.
- 4) ノロウイルスの検出法。厚生労働省ホームページ <http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/kanren/kanshi/dl/031105-1a.pdf>
- 5) 野田 衛, 岡本玲子, 有田知子ほか: 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)。日本ウイルス学会第55回学術集会, 2007.
- 6) 西尾 治, 吉田太郎: 現代社会の脅威ノロウイルス-感染症・食中毒事件が証すノロウイルス伝播の実態, 幸書房, 東京, 2008.
- 7) Kobayashi S, Natori K, Takeda N *et al.*: Immunomagnetic capture RT-PCR for detection of norovirus from foods implicated in a foodborne outbreak. *Microbiol Immunol* 48: 201-204, 2004.
- 8) 西尾 治: 厚生労働科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）「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13年度総括・分担研究報告書, 2002.
- 9) 森 功次, 林 志直, 秋場哲哉ほか: ふきとり材料からのノロウイルス検査法。第27回日本食品微生物学会学術総会, 2006.
- 10) 西尾 治: 厚生労働科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）「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, 2003.

- 11) ウイルス性下痢症検査マニュアル(第3版). 国立感染症研究所ホームページ <http://www.nih.go.jp/niid/reference/index.html>
- 12) Okada M, Yamashita Y, Oseto M *et al.*: The detection of human sapovirus with universal and genogroup-specific primers. *Arch Virol* 151: 2503-2509, 2006.
- 13) Oka T, Katayama K, Hansman GS *et al.*: Detection of human sapovirus by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Med Virol* 78: 1347-1353, 2006.
- 14) Sakon N, Yamazaki K, Utagawa E *et al.*: Genomic characterization of human astrovirus type 6 Katano virus and the establishment of a rapid and effective reverse transcription-polymerase chain reaction to detect all serotypes of human astrovirus. *J Med Virol* 61: 125-131, 2000.
- 15) Yamashita T, Ito M, Kabashima Y *et al.*: Isolation

and characterization of a new species of kobuvirus associated with cattle. *J Gen Virol* 84: 3069-3077, 2003.

- 16) 葛谷光隆, 藤井理津志, 濱野雅子ほか: 教育研修施設で発生したヒトC群ロタウイルスによる集団胃腸炎事例. *感染症学雑誌* 77: 53-59, 2003.
- 17) Echavarría M, Forman M, Ticehurst J *et al.*: PCR method for detection of adenovirus in urine of healthy and human immunodeficiency virus-infected individuals. *J Clin Microbiol* 36: 3323-3326, 1998.
- 18) 病原体検査マニュアル, 国立感染症研究所ホームページ <http://www.nih.go.jp/niid/reference/index.html>
- 19) 埼玉県衛生研究所: 地域保健推進特別事業報告書 ウイルス性食中毒の効率的な原因究明及び行政支援に関する研究, 2006.
- 20) 斎藤博之, 柴田ちひろ, 門脇さおりほか: 給食のパンが原因と考えられたノロウイルスによる食中毒—秋田県. *病原微生物検出情報* 28: 112-113, 2007.

* * *

1975年の初版発行以来, 圧倒的な信頼を得ているロングセラー。

予防接種の 手びき 〈第12版〉

木村三生夫/平山宗宏/堺 春美 編著

A5判 612頁 定価6,825円(本体6,500円+税5%)

ISBN978-4-87402-148-4

2008年10月発行



近代出版

〒150-0002 東京都渋谷区渋谷2-10-9
TEL 03-3499-5191 FAX 03-3499-5204
<http://www.kindai-s.co.jp>

微生物試験法の国際規格に どう対応していくか

国立医薬品食品衛生研究所 五十君 静信

はじめに

海外では、FAO/WHOやCODEX委員会が連携し、食品における病原微生物のリスク評価が進んでおり、科学的根拠に基づいた規格基準作りが行われている。科学的な根拠を基に、微生物の規制や制御を行ってゆく方向性は定まってきた。リスク評価の結果を受けて食品における微生物のリスクマネジメントを行うためには、科学的根拠に基づいた信頼性の高い微生物試験を行わなくてはならない。微生物試験の妥当性を確認するために、試験法のバリデーション方法の国際的な標準としてISO16140¹⁾が示されている。AOACもこの文書に従い、試験法のバリデーションを行っている。

一方、国内で行われている食品の微生物試験法は、公的な文書で示された公定法が基本である。公定法である告知・通知法は長期にわたり用いられているものが多い。一部の試験法では修正が加えられているが、多くの公定法はほとんど修正されないでそのまま用いられている。近年、新たに規格が設定された病原体に関する試験法を除き、大幅に変更された試験法は少ない。試験法が作られた時期が古いとその後検討された試験法に対する議論が反映されておらず、海外の標準的な試験法と試験結果の互換性などで問題が起こることがある。また遺伝子や免疫学的手法を用いた迅速簡便法を早急に導入すべきだという意見もある。この様な状況を受けて、現在、食品における微生物試験すなわち、食中毒起因細菌や汚染指標菌の食品における試験法に関する関心は高まっている。

本稿では、これまでの国内の食品に

おける微生物試験法の現状を解析し、微生物試験を国際規格にどの様に合流していくかについて考えてみたい。

1. 食品の微生物試験における日本の公定法

食品衛生法による成分規格として微生物規格が定められている場合、その試験法も示されている。示された試験法に従い行った結果をもって、微生物規格が満たされているかの評価を行うのである。すなわち微生物規格の定められている食品は、法的根拠のある試験法に従い評価される必要がある。食品衛生法で具体的な試験法が示されていない場合には、厚生労働省からの省令や通知により試験法が示される。その他、条例により都道府県の独自の指導基準等が示され、その中に試験法が示されている場合もある。このような行政的な規制に関わる微生物の検査では、関連する文書に述べられた試験法により適切に実行されなければならない。食品における微生物規格と共に行政機関から示されている微生物試験法が公定法である。

一方、わが国において公定法としばしば混同されているのが、食品衛生検査指針微生物編²⁾に述べられている微生物試験法である。この食品衛生検査指針に述べられている方法は、“公定法”ではないことを理解していない方が多く、試験法の議論ではしばしばこの点が混乱を招くこととなる。

2004年に発行された最新の食品衛生検査指針微生物編では、その巻末に公定法が一覧で示してあるが、昭和26年に省令が一部改正されているもの大筋が残されている。通知法では昭和38年の通知法が現在も生きています

という状況である。

2. 食品衛生検査指針による試験法

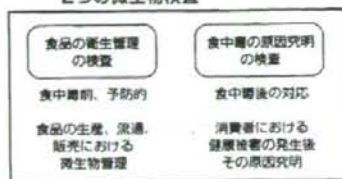
公定法のない病原微生物は、食品衛生検査指針に示されている試験法が用いられることが多い。食品に関する微生物試験を行う試験室ではおそらく例外なく所蔵している指針であり、この書籍に記載されている方法が公定法であると誤認している方も多い。最新版の検査指針微生物編では、市販の入手可能なキット類がその試験精度に関係なく一律に収載されており、試験法の事典のような機能も持っている。再度確認しておくが、検査指針に述べられている方法は、公定法ではない。

検査指針の原稿は当該微生物の専門家が執筆を担当し、プロトコルを作成する。そのプロトコルは試験法としての精度に関する考察や検討が加えられているが、試験法の精度に関する考え方が統一されているわけではなく、収載されている試験法は公定法のような妥当性確認は行われていない。指針の版を改める時、あるいは担当者が代わった時などには、試験法は十分な実行性の評価を受けることなくプロトコルが書き換えられてきた。検査指針の試験法の執筆を担当する研究者は、当該微生物の専門家ではあるが、当該微生物の検出法の代表的な例を示しているという認識で、試験法の妥当性確認を充分に行って、衛生検査に耐えうる実行性のあるプロトコルを作成しているわけではない。

3. 食品の衛生検査としての微生物試験とは

食品を対象とした微生物試験におい

図1 食品を対象とする目的の異なる2つの微生物検査



て、目的が異なる2つの検査がある(図1)。食品の安全性を担保する衛生検査と食中毒の原因究明を目的とする検査である。前者の衛生検査では、病原微生物が含まれないという結果を得ることが目標であり、試験結果は陰性であることが圧倒的に多く、信頼性が高い試験法で陰性であることを証明することが重要である。一般に“陰性”の証明は容易ではなく、衛生検査では試験法の妥当性が十分に確認されている試験法の手順をプロトコルに従って間違いなく進め、試験結果をだすことが必須である。“検出すること”を主な目的として作成された試験方法では信頼できる試験結果は得られない。さらに試験担当者が個人の判断で試験法のプロトコルを変更してしまうことはあり得ない。

一方、食中毒の原因究明のための検査では、食中毒起因細菌を確保すること、すなわち“検出すること”が目的であり、そのためには、試験法のプロトコルを一部変更することも多い。むしろ、培地などの組み合わせもある程度流動性を持たせ、最新の手法を導入して、迅速な菌の確保を優先する。遺伝子や免疫学的手法も取り入れ、効率よく病原微生物の存在を絞り込み、疑わしい菌を確保した上で、その性状から病原体であることを確認する。病原微生物を確保した場合は、同時に用いた手法の正当性を検証したことになる。これらの目的の異なる2つの試験はこれまでしばしば混同されてきた。

繰り返される食品の衛生検査のための微生物試験は、主な目的は病原微生物が存在しないことを確認する試験である。この試験では十分な検討済みの試験法で病原微生物が検出されないことをもって有害微生物の混入がないことを示す。“誰もが認める試験法で行っても検出できなかった”という頑強性が必須である。もし充分でない試

験法を用いれば、病原体が存在しても検出されないという事態が起こり、当該食品により人の健康障害が発生してしまうことになる。衛生検査では、実行性が確認されている(バリデーションされている)試験法の手順を間違いなく進め、試験を行うことが必須である。

これに対して、地方衛生研究所などの行政機関では、食品の衛生検査と食中毒発生時の原因究明の検査を併行して行うことが多い。食中毒の原因究明のための検査では、食中毒は既に発生しており、食中毒起因細菌を確保することが目的であり、そのためには、試験法のプロトコルを一部変更することが有用であることがある。むしろ、培地などの組み合わせもある程度流動性を持たせ、より新しい手法を導入して、菌の確保を優先したほうが良い場合も多い。利用が可能であれば、遺伝子診断や免疫学的手法も取り入れる。菌を迅速に確保することが目的であるので、当該微生物が確保できれば目的は達成される。

これまで、このような目的の異なる2つの試験法が混同されてきたため、特にこれらの業務を併行して行う機関において、衛生検査にも新しい培地や手法などを取り入れて微生物試験のプロトコルを変更すること、あるいは十分な妥当性確認が行われていない試験法を用いることがあってはならないことが正しく認識されていない傾向にあった。衛生検査に対する意識改革が必要である。食中毒事例の原因究明の検査は、食品の衛生検査とは全く別であることを認識することが重要である。食品の衛生検査では、試験法のプロトコルに従って試験を行うこと、そしてその試験法は、妥当性確認された試験法でなければならない。

4. 海外の微生物試験標準法

主要な国はそれぞれの国の微生物試験法を持つ。例えば、アメリカは、FDAの示すBacteriological Analytical Manual(BAM)法が、公定法である。アメリカでは、BAM法に対して試験法の同等性が示された方法を、それに準じた方法として認めている。AOACでは、提案された試験法がBAM法と同等であるという検証を行

い、十分なデータが得られた試験法についてAOAC法として公開している。AOACに試験法として認められるには、膨大なデータが必要であり、そのため膨大な費用を必要とする。提出されたデータは科学的に分析され試験法としての妥当性が評価される。それ故、AOACで妥当性が確認された方法は、BAM法と同等なものと認識され公的な試験法としても認められる。AOAC法は、アメリカ国内のみならず国際的にも広く認められている。これは、AOACによる妥当性確認(バリデーション)が、科学的に高い信頼性があると国際的に認識されているためである。

ヨーロッパを中心に国際的な標準法として認識されているのはISO法である。ヨーロッパでは、独自に標準法を持つ国もあるが、EUとして統一した食品の微生物規格を進めている。CODEXでは、リスク評価に基づき食品の微生物規格を議論し、策定し始めている。その試験法としてはISO法を用いる。ISO16140で試験法のバリデーションについて細かく定めており、微生物の標準的な試験法はISO16140に従い妥当性確認が行われ、プロトコルが策定されている。CODEX規格は国際的な標準とされており、ISO法がその規格に対する試験法である。

5. 国内の微生物試験法の問題点

日本では、多くの公定法が長期にわたり見直されていないことから、国際的に広く用いられている標準的な試験法と培地の種類が異なるなどの理由から、海外との試験結果の互換性が問題となる場合がある。例えば、黄色ブドウ球菌試験法では、国内の試験法では、選択剤として高濃度食塩を用いるマニトール食塩培地が用いられているのに対し、国際的な標準法では、損傷菌対応を重視し、複数の薬剤の選択剤を利用したベアードパーカー培地を用いている。微生物試験においてベースとなる培地の種類が異なると、試験結果が一致しないことが起こりうる。今日のように食品供給が国際的に行われていることを考えると、食品の微生物試験法は国際的に互換性があることが重要である。

海外の食品を対象とした微生物試

試験法は、損傷菌対応型の培地を採用するようになってきている。国内の試験法はこの様な対応が遅れているといえる。例えば、リステリアの試験法は、国内では1993年に乳製品から検出するための通知法として出されている。この方法は、当時の国際酪農連盟 (IDF) が示した国際的な標準法に準拠して作られていた³⁾。一方、IDFは、リステリアの試験法を検討し、ISOと共同で、ISO/IDF法として、リステリアの新しい試験法を示した。米国ではこれと同等な試験法が、FDAからBAM法として2003年に示されている⁴⁾。ISO/IDF法とBAM法は、用いている培地などは共通であり、互換性があるといえる。さらにIDFは以前の試験法を今後用いないことを2007年に正式に決議した。以前のIDF法は国内の試験法の基となっていたことから、現在国内のリステリア試験法は、その根拠とした試験法が国際的な試験法から外されている状況である。

カンピロバクターの場合は、食中毒起因菌であるが食品としての微生物規格がないため、国内では公定法が示されていない。従って、食品のカンピロバクターの試験を行う場合は、食品衛生検査指針微生物編や研究報告書あるいは学術論文などの文献を参考に試験実行者が検討した独自の試験法を用いているのが現状である。このような自前で作成した検査法は、充分な妥当性確認を行うことは困難で、食品の衛生検査に用いるとすると試験結果の信頼性が担保されているとは言い難い。

6. 食品からの微生物試験法に関する国内の動向

国内の食品における微生物試験法の実情は、海外の標準法策定の実情を考えると、今後大きく変わってゆく必要がある。食品の微生物試験法に国際的に通用するレベルの信頼性をもたせ、実行性の高い試験法とするには、食品の試験法がどうあるべきかの議論を行ったうえで、同一の方向性を持った試験法を策定する必要がある。平成17年度から厚労科研究費により、研究班が作られ食品の細菌検査に關係す

表1 標準試験法作成方針で示された試験法策定の進め方

原案(ステージ1): 標準法検討委員会(親委員会)は、作業部会を立ち上げる。作業部会は文献調査や情報収集により、関連する国際的な標準法の比較表を作成し、それを基に「原案のたたき台」を親委員会に提出する。親委員会では、このたたき台を議論し、当該試験法の方向性を確認した上で、「原案」としてまとめる。その作成方針を含めて、インターネット上に公開。期間を設定し意見を求める。ここで、文書にて第三者組織(日本食品微生物学会や、衛生微生物技術協議会等)の意見を求める。

作業部会案(ステージ2): 各作業部会は、国立研究機関、大学、地方衛生研究所、食肉検査所、登録検査機関、検査所等の協力を受けながら原案の検討箇所を設定し、実験データから細かいプロトコルの検討を行い、主要な指摘がある場合はそれを考慮した「作業部会案」を作成する。作業部会案は、親委員会に提出するとともに、一定期間インターネット上で公開し広く意見を求める。さらに、文書にて第三者組織の意見を求める。

コラボ実施案(ステージ3): インターネットや第三者組織の意見などを参考とし、親委員会は作業部会案について議論し、「コラボ実施案」とする。コラボスタディーの規模や協力施設の数を示し、インターネット上で公開し、意見を求める。コラボスタディー参加者を募る。

標準法(最終ステージ): 作業部会は、複数の試験検査機関でコラボスタディーによりその実行性を評価する。親委員会は、コラボスタディーの結果を受け、作業の進捗が方針に従って行われているかの確認を行った後、「標準法」として公開する。

る専門家を集め、食品の微生物試験法はどうかの議論が進められており、その検討内容はインターネットのホームページ (<http://www.nihs.go.jp/fhm/kennsahou-index.html>) で公開されている。「食品からの微生物検査標準法検討委員会」を立ち上げ、今後の食品の細菌試験の方向性を議論し、その基礎となる標準試験法作成のガイドラインを作成した。この作成方針では、試験法の進め方を4つのステージに分けている。この委員会は、わが国における食品の細菌試験標準法はどうかの方向性を示すことを目的としている。国際的に広く認められている食品の細菌試験標準法が、どのように策定されているかの解析から、標準法作成を4つのステージに分けて検討(表1)し、標準試験法の策定を行う方法論(ガイドライン)を提案した。

現在、このガイドラインに従い、サルモネラ、黄色ブドウ球菌、カンピロバクター、腸炎ビブリオについて標準試験法の検討が進められている。検討されている標準法では、国際的な標準法であるISO法などとの互換性を考慮に入れると共に、提供される最終プロトコルは、そのまま試験が実行可能な程度に具体的な表現になることが期待される。今年度からは、ボツリヌス、リステリア、汚染指標菌である大腸菌群や大腸菌についても検討が開始される予定である。

国内の標準法は、ISO法との互換性

を持った方法に早急に整備されてゆく必要がある。国際的な食品の微生物規格は、CODEXが中心となり、リスク評価を行った上で、科学的な根拠を持った規格作りが進められている。国内の微生物試験法がもしISO法との互換性がないならば、日本は独自のリスク評価を行い、互換性のない試験法のために独自の微生物規格を作り続けなければならないことになる。今後、食品に対して独自の規格を持ち続けることは有益とは思われない。すなわち、国際的な規格に従い、試験法も国際的な試験法と互換性のある方法に切り替えてゆかなければならない。加えて、試験法の精度管理に関しても、国際的なレベルに対応していく必要があると思う。

〈参考文献〉

- 1) ISO 16140: Protocol for the validation of alternative methods. 2003
- 2) 厚生労働省監修: 食品衛生検査指針(微生物編) 東京: 日本食品衛生協会. 2004
- 3) International Dairy Federation: Milk and milk products - detection of *Listeria monocytogenes*. IDF standard 143A. 1995
- 4) FDA: Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods. Bacterial Analytical Manual. 2003

〈著者略歴〉

五十君 静徳(いじみ しずのぶ)
 89年 東京大学大学院修了
 同年 国立予防衛生研究所(現国立感染症研究所) 研究員
 96年 米国メリーランド大学医学部留学
 02年 国立医薬品食品衛生研究所室長
 現在 麻布大学および岐阜大学大学院客員教授
 趣味 自然観察

食品からの微生物検査標準法の検討

～これまでの経緯とこれからの展望～

五十君 静信

Igimi Shizunobu

国立医薬品食品衛生研究所

1. はじめに

FAO/WHOやCODEX委員会が連携し、食品における病原微生物のリスク評価が進んでおり、科学的根拠に基づいた国際的な食品の規格基準作りが進められている。科学的な根拠を基に、微生物の規制や制御を行うという方向性は定まってきた。リスク評価の結果を受けて食品における微生物のリスクマネジメントを行うには、科学的根拠に基づいた信頼性の高い微生物試験を行う必要がある。微生物試験の妥当性確認を行うための国際的な標準としてISO16140¹⁾が示されている。一方、国内の食品の微生物試験法は、公的な文書で示された公定法が基本である。公定法である告知・通知法は長期にわたり変更されていないものが多い。一部の試験法は修正されているが、多くの公定法はほとんど修正されていない。近年、新たに規格が設定された病原体に関する試験法を除き、見直しや変更が加えられた試験法は少ない。試験法が作られた時期が古いとその後行われた試験法に対する議論が反映されておらず、随時変更が行われている海外の標準的な試験法と試験結果の互換性などで問題が起こることがある。また遺伝子や免疫学的手法を用いた迅速簡便法を早急に導入すべきだという意見もある。このような状況を受けて、現在、食品における微生物試験すなわち、食中毒起因細菌や汚染指標菌の試験法に関する関心は高まっている。本稿では、これまでの国内の食品における微生物試験法の現状を解析し、微生物試験を今後どのように国際基準と合流していくかについて考えてみたい。

2. 食品の微生物試験における日本の公定法

食品衛生法による成分規格として微生物規格が定められている場合、その試験法も示されている。示された試験法に従い行った結果をもって、微生物規格が満たされているかの評価を行うのである。すなわち微生物規格の定められている食品は、法的根拠のある試験法に従い評価される必要がある。食品衛生法で具体的な試験法が示されていない場合には、厚生労働省からの省令や通知により試験法が示される。その他、条例により地方自治体独自の指導基準等が示され、その中に試験法が示されている場合もある。このような行政的な規制に係わる微生物の試験では、関連する文書に述べられた試験法により適切に実行されなければならない。食品における微生物規格と共に行政機関から示されている微生物試験法が公定法である。

一方、わが国において公定法としばしば混同されているのが、食品衛生検査指針微生物編²⁾に述べられている微生物試験法である。この食品衛生検査指針に述べられている方法は、“公定法”ではないことを理解していない方が多く、試験法の議論ではしばしばこの点が混乱を招くこととなる。

2004年に発行された最新の食品衛生検査指針微生物編では、その巻末に公定法が一覧で示してあるが、昭和26年の省令は一部改正されているものの大筋残されている。通知法では昭和38年の通知法が現在も生きているという状況である。

3. 食品衛生検査指針による試験法

公定法のない病原微生物は、食品衛生検査指針に示されている試験法が用いられることが多い。

食品に関する微生物試験を行う試験室ではおそらく例外なく所蔵している指針であり、この書籍に記載されている方法が公定法であると誤認している方も多い。最新版の検査指針微生物編には、市販の入手可能なキット類がその試験精度に関係なく一律に収載されており、試験法の事典のような機能も持っている。再度確認しておくが、検査指針に述べられている方法は、公定法ではない。

検査指針の原稿は当該微生物の専門家が執筆を担当し、プロトコルを作成する。そのプロトコルは試験法としての精度に関する考察や検討が行われてはいるが、試験法の精度に関する考え方が統一されているわけではなく、収載されている試験法は十分な妥当性確認が行われている訳ではない。指針の版を改めるとき、あるいは担当者が代わったときなどには、試験法は十分な実行性の評価を受けることなくプロトコルは書き換えられてきた。検査指針の試験法の執筆を担当する研究者は、当該微生物の専門家ではあるが、当該微生物の検出方法の代表的な例を示しているという認識で、食品の衛生試験に耐える実行性のあるプロトコルを作成しているわけではない。

4. 食品の衛生試験として微生物試験とは

食品を対象とした微生物試験において、目的が異なる2つの試験がある。食品の安全性を担保する衛生試験と食中毒の原因究明を目的とする試験である。前者の衛生試験では、病原微生物が含まれないという結果を得ることが目標であり、試験結果は陰性であることが圧倒的に多く、信頼性が高い試験法で陰性であることを証明することが重要である。すなわち誰もが納得できるほど信頼性の高い方法で間違いなく試験したのに検出されなかったのだから、菌はいないと主張できるわけである。一般に“陰性”の証明は容易ではなく、衛生試験では試験法の妥当性が十分に確認されている試験法の手順をプロトコルに従って間違いなく進め、試験結果を示すことが必須である。“検出すること”を主な目的として作成された試験方法では“陰性”の証明として充分とは言えない。さらに試験担当者が個人の判断で試験法のプロトコルを変更してしまうことは論外である。一方、食中毒の原因究明のための試験では、食中毒起因細菌を確保することすなわち“検出すること”が

目的であり、そのためには、試験法のプロトコルを一部変更することも多い。最新の手法を導入して、迅速な菌の確保を優先する。遺伝子や免疫学的手法も取り入れ、効率よく病原微生物の存在を絞り込んで行き、疑わしい菌を確保した上で、その性状から病原体であることを確認する。病原微生物を確保した場合は、同時に用いた手法の正当性を検証したことになる。これらの目的の異なった試験はこれまでしばしば混同されてきた。

繰り返しになるが食品の衛生試験のための微生物試験は、主な目的は病原微生物が存在しないことを確認する試験である。この試験では十分に妥当性確認された試験法で病原微生物が検出されないことをもって有害微生物の混入がないことを示す。“誰もが認める試験法で行っても検出できなかった”という頑強性が必要である。もし妥当性確認が充分でない試験法を用いれば、病原体が存在しても検出されないという事態が起こり、当該食品により人の健康障害が発生してしまうことになる。衛生試験では、妥当性確認（バリデーション）されている試験法の手順を間違いなく進め、試験を行うことが必須である。

これに対して、地方衛生研究所などの行政機関では、食品の衛生試験と食中毒発生時の原因究明の試験を併行して行うことが多い。食中毒の原因究明のための試験では、食中毒はすでに発生しており、食中毒起因細菌を確保することが目的であり、そのためには、むしろ培地などの組み合わせもある程度流動性を持たせ、より新しい手法を導入して、菌の確保を優先したほうが良い場合も多い。利用が可能であれば、遺伝子診断や免疫学的手法も取り入れる。菌を迅速に確保することが目的であるので、当該微生物が確保できれば目的は達成される。これまで、このような目的の異なる2つの試験法が混同されてきたため、特にこれらの業務を併行して行う機関において、衛生試験にも新しい培地や手法などを取り入れて微生物試験のプロトコルを独断で変更してしまう、あるいは十分な妥当性確認が行われていない試験法を採用することに抵抗がないといった傾向にあった。衛生試験に対する意識改革が必要である。食中毒事例の原因究明の試験は、食品の衛生試験とは全く別であることを認識することが重要である。食品の衛生試験では、試験法のプロトコルに従っ