

て試験を行わなければならない、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。

5. 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、充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、そのために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で妥当性確認された方法は、BAM法と同等なものとして認識され公的な試験法としても認められている。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では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。

6. 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、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として、国内では、選択剤として高濃度食塩を用いるマンニト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。損傷菌の検出をどのように対応するかなど、試験法に対する基本となる考え方が異なるとも言える。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が国際的に互換性があることは重要である。

食品を対象とした国際的な微生物試験法は、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よう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²⁾。一方、IDFは、リステリアの試験法を再検討し、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³⁾。ISO/IDF法とBAM法は、用いている培地など共通であり、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現在は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。したがって、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カンピロバクターの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選択した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試験法は、各自が妥当性確認を行う必要があり、妥当性確認を行わないで衛生試験に用いるならば試験結果の信頼性が担保されているとは言い難い。

7. 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、実効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年度から厚生労働省により、研究班が作られ食品の細菌試験に関係する専門家を集め、食品の微生物試験法はどうあるべき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”では、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の統一した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。

3年間、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きた。検討された標準法では、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っている。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。この規格を確認する試験法はISO法である。国内の微生物試験法がもしISO法と互換性がないならば、日本は互換性のない試験法のために、独自のリスク評価を行い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換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



いぎみ・しずのぶ

国立医薬品食品衛生研究所 室長

- 食中毒起因細菌の制御に関する研究
- 組換え乳酸菌を用いた機能製剤の開発
- 遺伝子組換え食品の安全性に関する研究

- 内閣府食品安全委員会専門委員
- 岐阜大学連合獣医学系大学院客員教授
- 厚生労働省・食品衛生審議会食品衛生分科会食品規格部会・食中毒部会委員
- 麻布大学客員教授

特集

施設環境に潜む食中毒リスクの低減に向けて

リステリアの汚染実態とその制御

国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
五十君静信氏

本稿は、昨年12月に日本HACCPトレーニングセンター（浦上弘理事長）の主催で開催された「第10回HACCPフォローアップセミナー」において、国立医薬品食品衛生研究所の五十君静信氏が行った講演の要旨である。（編集部）

リステリアとリステリア症

リステリアは、1980年代以前までは動物の感染症の原因菌と考えられていた。反芻獣（牛、羊など）の流産や脳炎の原因菌として認識されていたが、人の脳髄膜炎や敗血症の原因、流産の原因となることが判明してきたことから、食中毒菌として注目されるようになってきた。ただし、リステリア症は、一般的には高いレベルの菌数を摂取しなければ発症しない。そのため、高い菌数のリステリアに汚染された食品などを、経口的に摂取することでリステリア症は引き起こされると考えられる（低い菌数では発症しないため、人から人への感染は起こりにくい）。

リステリア症は、大きく初期症状（比較的症状が軽いもの）と重症化した症状に分けられる。

初期症状としては、38～39℃の発熱、頭痛、悪

寒、嘔吐など、インフルエンザ様の症状を示す。風邪症状に似ているため、症状だけを見てリステリア症であるかどうかを判別することは不可能である。一般に感染後24時間程度で発症する。

重症化すると、全身性、神経系の症状を呈する。重篤な場合、髄膜炎や敗血症を呈することもある。感染から発症までの期間は1～6週間程度と幅がある。そのため、リステリア症の原因食品や感染経路を特定することは非常に難しいのが現状である。また、妊婦が感染すると、その胎児に対して強い影響があらわれる。妊婦は軽いインフルエンザ様症状を呈するだけであっても、胎児は早産や死産となる場合がある。新生児では髄膜炎・敗血症の原因となることがある（リステリアが新生児の髄膜炎・敗血症の原因になった事例は、世界的に見ても決して少なくない）。

なお、通常は、一般的な食中毒菌のような胃腸炎症状（腹痛や下痢など）は見られない。このことも、リステリア症の原因食品や感染経路の特定が難しい理由の一つである。

リステリア食中毒の発生事例

リステリア症のほとんどは食品を介して感染する。そこで、世界で確認された食品媒介リステリア症の集団発生の事例をまとめた。

乳および発酵乳製品による集団事例

表1は乳および発酵乳製品によるリステリア症の集団事例である。チーズによる集団事例が非常に多いことがわかる。これらの事例では、リステリアが食品中で高い菌数まで増殖し、かつ消費者は喫食前に加熱等の調理を行わない。多くの事例で、リステリアは1g当たり 10^6 以上という高いレベルの菌数に達していた。乳および発酵乳製品は、リステリア症の原因食品として最もリスクが高い食品カテゴリーと言える。

市販の未殺菌乳におけるリステリアの汚染状況を調査した文献によると、海外では市販製品の数%がリステリア菌に汚染されていることが報告されている。したがって、基本的には「未殺菌乳はリステリア食中毒のリスクが高い」という認識を持たなければならない。幸い日本では、加熱殺菌を施した乳しか流通していない。また、発酵乳製品の製造・加工においても、一度は加熱殺菌された乳が使用されているので、このカテゴリーでのリステリア症は起こりにくいのではないかと。

表1 乳および発酵乳製品による主な集団事例

発生国	発生年	患者数(死者)型	原因食品
東ドイツ	1949-57	~100	未殺菌乳、チーズ
アメリカ	1979	20	牛乳、生野菜
イギリス	1981	11	クリーム
アメリカ	1983	49 (14) 4 b	殺菌乳
オーストリア	1986	20	生乳、野菜
アメリカ	1987	11	バター
アメリカ	1994	45 (0) 1/2 b	チョコレートミルク
フィンランド	1998-99	25 (6) 3 a	バター
スイス	1983-87	122(34) 4 b	チーズ
アメリカ	1985	142(48) 4 b	チーズ
デンマーク	1989-90	23 (6) 4 b	チーズ
フランス	1995	33 (4) 4 b	チーズ
フランス	1997	14 (0) 4 b	チーズ
アメリカ	2000-01	12 (5) 4 b	チーズ
カナダ	2002	17 (0)	チーズ

食肉加工品による集団事例

次いで集団事例が多いカテゴリーは食肉加工品である(表2)。日本国内で市販食肉加工品のリステリア汚染について調査してみると、だいたい30~40%は汚染を受けていることがわかる。

食肉加工品におけるリステリアの管理では、①生肉に直接的に汚染しているリステリア菌の問題、②生肉を取り扱った装置や器具などを介して起こる間接的な汚染(環境からの二次汚染)の問題がある。このような汚染経路を、どのように断ち切るかを考えることが重要である。また、リステリアは低温でも生育可能な菌であることから、低温流通時における菌の増殖をどのように抑えるかも重要な課題である。

野菜による集団事例

野菜類による集団事例も意外と多い(表3)。とりわけ、1981年にカナダで発生したコールスローサラダによるリステリア食中毒(死者数は17人にも及んだ)は「リステリアは非常にリスクが高い食中毒菌である」ということを、初めて世界的に認識させた事例として知られている。この事件の原因食品となったサラダに使われたキャベツを納入した農場は、事件の当該年度とその前年度に、羊がリステリア症で死亡していた。そのため、その羊のふん尿が直接的あるいは間接的に野菜を汚染したことが、感染経路として考えられている。

表2 食肉加工品による主な集団事例

発生国	発生年	患者数(死者)型	原因食品
イギリス	1987-89	355(94) 4 b	パテ(肉調理品)
オーストラリア	1990	11 (6) 1/2 a	ミートパテ(肉調理品)
フランス	1992	279(85) 4 b	ブタ舌調理品
フランス	1993	31 (11) 4 b	パテ(肉調理品)
アメリカ	1998-99	101(21) 4 b	ホットドック
フランス	1999-00	26 (7) 4 b	ブタ舌調理品
アメリカ	2000	29 (7) 1/2 a	七面鳥調理品
アメリカ	2001	16 (0) 1/2 a	七面鳥調理品
アメリカ	2002	63 (7)	七面鳥調理品

生野菜をはじめとする野菜類は、消費者が喫食前に加熱等の処理をしないで食べることが多い。また、野菜は洗浄のみで、リステリアの感染予防に万全を期することは困難である。そのため、原料野菜にリステリア汚染が起きると、集団事例にまで発展する可能性がある。また、コールスローサラダの場合、サラダを柔らかくするために熟成期間がある。その間に菌数が高くなることも考えられる。さらに、先にも述べたように、リステリアは低温下でも生育できるため、保管・流通時の低温管理を徹底していても、その間に菌が増殖する可能性がある。

リステリアは農場を中心に広く分布している。野菜を介した感染が起こり得ることは、十分に認識しておかななくてはならない。

その他の集団事例

その他の食品による主な集団事例としては、1980年に魚介類を原因に発生した事例（患者数22人、ニュージーランド）、1986～87年に生卵を原因に発生した事例（患者数33人、米国）、1989年にエビを原因に発生した事例（患者数10人、米国）などが報告されている。

また、1990年代には、冷蔵庫内で比較的長期間保存する燻製魚介類を原因食品とするリステリア症が、オーストラリア、ニュージーランド、スウェーデンで報告された。この事件を受けて、日本国内でも市販の燻製魚介類におけるリステリア汚染について調査したところ、1g当たり 10^3 を超えるリステリアが検出された検体が報告された。そのため、この種の食品についても、リステリア予防に対する認識と対策が必要である。

表3 野菜類による主な集団事例

発生国	発生日	患者数(死者)型	原因食品
オーストラリア	1978-79	12	生野菜
アメリカ	1979	20	生野菜、牛乳
カナダ	1981	41 (17) 4b	キャベツサラダ
オーストリア	1986	20	生乳、野菜
イタリア	1993	18 (0) 1/2b	ライスサラダ
イタリア	1997	1566(0) 4b	コーンサラダ

日本におけるリステリア症の実態

日本ではリステリア症に関する十分なデータが報告されていない。そのため「日本にはリステリア症のリスクはないのではないか」という意見も聞かれる。そこで、かつて日本国内における人のリステリア症の発生状況について、アクティブ・サーベイランスを実施したことがあるので、以下に概要を紹介する（厚生科学研究「食品由来のリステリア菌の健康被害に関する研究」）。

この調査では全国2258施設の病院（病床数100床以上の救急告示病院）を対象にアンケート調査を実施した。調査対象となった病床数は68万6902床。2000年当時のデータで全国の病床数が164万7253床なので、全病床のうちの41.6%を対象に調査を行ったことになる。また、調査の結果、リステリア症を発症していることがわかった場合には、現地での調査も行った。

2258施設のうち、アンケートに協力した病院は773施設（調査対象の34%）。そのうち、リステリア菌の検出、分離あるいは診断をした経験がある病院は194施設であった。1996年～2003年3月までのサーベイランスの結果をまとめると、総計患者数は95人、患者数の単年度当たりの平均は13人となった。そのため、病床数から推定した年間患者数は83人、人口100万人当たりの罹患率は0.65人と推定された。

ちなみに、同時期における世界のリステリア罹患患者数（人口100万人当たり）は、米国で5人（1998年）、フランスで4.1人（1997年）、英国で1.6～2.5人（1990年代）、オランダで0.7人（1991～1995年）と推定されている（米国とフランスは世界でもリステリア症の報告が多い国である）。また、FAO/WHOの報告によると、EUにおけるリステリア症の罹患患者数は0.3～7.8人である（2000～2001年）。すなわち、日本においても、EU諸国と大差ない割合でリステリア症が発生していると考えるのが妥当であろう。

また、この調査において1996～2002年にリステリア症として報告された42症例を、年齢層別に分類すると図1の通りである。ほとんどが新生児や

高齢者で起きていることがわかる。42例のうち死亡者は9例（致死率21%）であった。国際的に「重症化したリステリア症の致死率は約20~30%」と言われていたが、ほぼ同様の致死率と言える。なお、死亡者は全員61歳以上の高齢者であった。

市販食品における リステリア汚染の実態

加熱等の処理をせずにそのまま喫食する、いわゆるready-to-eat food（RTE食品）における、リステリア汚染の実態調査の結果の一例を表4に示した。

ナチュラルチーズは、国際的にもリステリアのリスクが高い食品として認識されているが、日本の国内メーカーは加工時に加熱処理を施しているため、表4に示すようにリステリア・モノサイトゲネス（*L. monocytogenes*、以下「Lm」）は検出されなかった。輸入品については1387検体のうち2.4%からLmが分離された。ただし、最近の調査では、輸入品でもLmはほとんど分離されなくなってきたようだ。

また、表4では、生鮮魚介類で1.5%（2659検体）、加工魚介類で4.0%（526検体）、総菜で1.0%（613検体）、肉加工品で4.8%（246検体）、野菜で0.3%（314検体）、スモークサーモンで5.4%（92検体）の割合でLmが検出されている。この割合は、最新の調査でもそれほど大差ない。日本の食文化では（他国と比べて）生鮮魚介類の消費量が多い。そのため、日本人が一般的な食生活を送っていれば、おそらく1~2週間に1回は、低い菌数のリステリアを含む食品を摂取していると考えられる。そのような状況にさらされているにもかかわらず、人口100万人当たりのリステリア症の罹患者が0.65人でおさまっているのは、非常に注目すべきではないか。

食肉（牛、豚、鶏の生肉）におけるLmの汚染率を表5に示した。生の食肉は30~40%程度の確率でLmに汚染されていることは認識しておくべきである。食肉加工品は加熱してから喫食するので、肉そのものがリステリア症の原因食品となる

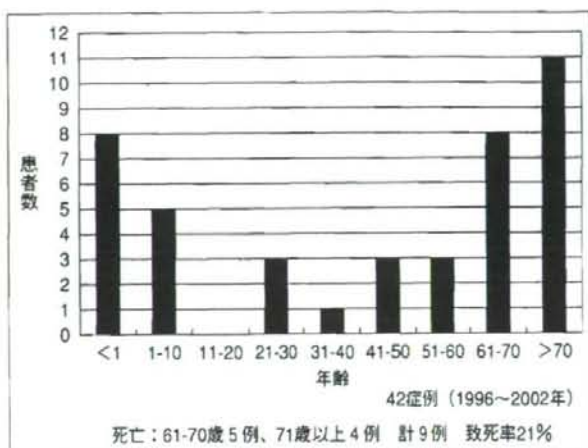


図1 リステリア症患者の年齢別分布

可能性は低いだろう。しかし、生肉を取り扱った後の器具（まな板や包丁など）を介して、Lmが二次汚染する可能性は十分に考慮されるべきである。二次汚染による食中毒は決して軽視してはならない。

以上のことから日本のリステリアの実態をまとめると、第一に「日本ではリステリア症がほとんどない」という認識は正しくない。年間83例ほどのリステリア症が発生していることが推測され、これは欧米諸国と同程度の発生確率と言える。また、第二に「日本の食品はリステリア汚染が海外に比べ少ない」という認識も誤りである。わが国の食品の汚染実態を調査すると、欧米諸国と同程度の水準で、市販食品がリステリアに汚染されていることが明らかである。むしろ、生の魚介類を喫食する食習慣を持つ日本人にとって、一般的な食生活の中でリステリア菌に暴露される可能性は、欧米よりもはるかに高いと考えるべきである。それにもかかわらず、日本人のリステリアの発症確率が欧米と同程度であることは、今後、研究していく価値があるかと思う。

以上の事実を客観的に考えると「日本では、食品を介したリステリア症が発生しない」というだけの根拠は存在しない。国内でも、食品を介したリステリアの感染、集団発生は十分に起こり得ると考えるべきである。

日本で報告されている リステリアの集団事例

日本において、リステリアによる集団発生と認知されている事例は、2001年3月に北海道で報告された1例のみである。以下に当該事例の経緯を簡潔に紹介する。

2001年3月北海道の行った定期検査時において、自家製ナチュラルチーズ123検体についてLm汚染を調査したところ、1検体から高濃度のLmが検出された。そこで、月14～22日にかけて当該施設製品の追跡調査を実施したところ、喫食者86人を特定し、そのうちの44%に相当する38人が有症者であることがわかった（疫学調査における摂食者数および有症者数は表6の通りであった。酪

表4 RTE食品におけるLm汚染の実態

	サンプル数	Lm分離数	Lm陽性率
ナチュラルチーズ			
国産	1,075	0	0
輸入	1,387	33	2.4
その他			
生鮮魚介類	2,659	41	1.5
加工魚介類	526	21	4.0
結露	613	6	1
肉加工品	246	12	4.8
野菜	314	1	0.3
スモークサーモン	92	5	5.4

表5 食肉におけるLm汚染の実態

	サンプル数	Lm分離数	Lm陽性率
牛			
枝肉	4,231	217	5
薄切り	378	101	27
挽肉	49	11	22
豚			
枝肉	4,421	355	8
薄切り	397	128	32
挽肉	104	20	19
鶏			
屠鳥	331	49	15
薄切り	350	140	40
挽肉	53	22	42

表6 疫学調査における摂食者数および有症者数

購入施設	摂食者数	有症者
製造工場	18	11(61%)*
催事	68	27(40%)**
小売店	0	0
合計	86	38(44%)

*基礎疾患あり、**妊娠中

農品を取り扱う催事が開催されたことから、多くの喫食者および有症者が確認された。分離菌株の疫学的検討を行ったところ「食品を介したリステリア集団事例の可能性はある」と認められ、当該事件の詳細が国際的な文献等で公表された。

ウォッシュタイプのチーズ（表面を海水や塩水、ワインで洗うタイプのチーズ。フランスで人気が高いタイプである）から、100g当たり 9.3×10^6 のLm（血清型1/2b）が検出された。なお、この当該工場における保存品の調査では、ウォッシュタイプのチーズで1g当たり 10^7 レベル、カマンベールチーズで1g当たり 10^4 レベルのLm（血清型1/2b）が検出された。

この施設のさまざまな箇所、Lmのふき取り検査を行ったところ、牛舎内外で5検体、製造室・熟成庫で3検体、搾乳室～バルククーラーで2検体、排水で1検体、製造従事者検便で1検体のLmが検出された。

この事例における発症者の臨床症状を調べたところ、風邪様症状と急性腸炎症状を併発した人が約半数を占めた（急性腸炎症状のみを呈した人はいなかった）。リステリア症では、一般的な食中毒のような胃腸炎症状を呈することはあまりないが、当該事例では菌数が高かったことから、風邪様症状と急性腸炎症状の両方を併発した人が約半数を占めた（図2）。

この事例は、今のところ国内で唯一の「食品を介したリステリア集団感染事例」である。原因はチーズ製造環境を広く汚染していた菌の混入によるものと推測された。Lm（血清型1/2b）の濃厚汚染を受けたナチュラルチーズの摂取による非侵襲型（non invasive type）のリステリア症の事例となった。当該農場に分布していたLmの血清型は、ほとんどが1/2bであった。この血清型は重篤化しにくい血清型とみなされているので、38人が有症者数として認められながら、幸いにも死者はいなかった。しかし「もし、分布していたのが、世界的にも死亡事例が報告されている血清型4bだったとしたら…」と考えると恐ろしい。「日本ではリステリアの集団事例は起こらない」と油断することはできないのではないかとと思われる。

各国のリストeriaの管理体制

各国のリストeriaの管理体制において規制対象として考えられる食品は、非加熱で喫食する食品（いわゆるready-to-eat食品）である。しかし、その規格・基準の基本的な考え方は、米国と欧州では大きく異なる。

米国の場合

米国では「食品中からリストeriaが検出されてはならない」という、いわゆるゼロ・トレランスの方針である。このような厳しい基準が規定されている背景には、米国特有の事情がある。

米国では1996年前後のアクティブ・サーベイランスによって、リストeriaによる年間の患者数は約2500人、死者数は約500人と推測された。また、実際にリストeriaによる集団事例もたびたび経験している。リストeriaにひどく苦しめられている国である。また、リストeriaは低温でも増殖できるので、米国では「食品流通時に増菌する可能性があるので、消費者が摂取する直前の最終的な菌数を担保することはできない」と考えている。

そのため、米国政府は、食品業界に対して厳しいリストeria管理を要求しており、結果としてゼロ・トレランスが規定されている。現在も、パルスネットの整備等を通じて、広域的な発生の掌握や感染拡大の阻止に努めている。

欧州やカナダの場合

欧州やカナダでは、いわゆるゼロ・トレランスではなく、一定菌数までの菌の存在を許容している。これは国際的な一般的な流れでもある（下記「国際機関における取り組み」参照）。

市販食品の多くがリストeriaに汚染されていることは事実である。しかし、消費者が低い菌数のリストeriaを摂取したところで、食中毒のような健康被害が発生する可能性は低い。また「ゼロ・

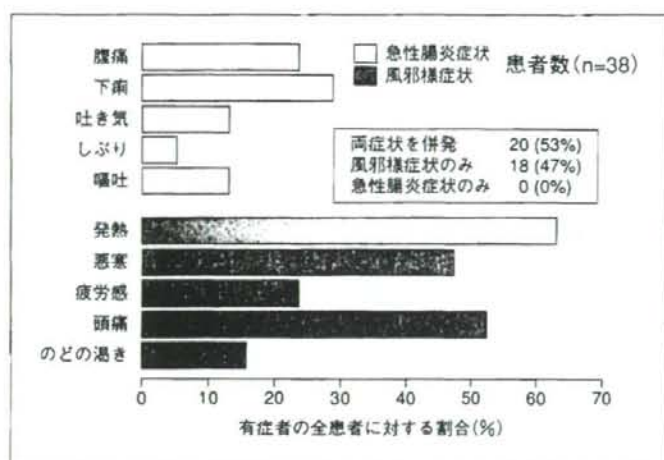


図2 当該事例における発症者の臨床症状

トレランスは現実的ではない」という業界の認識もある。そのため、一部の食品を除いて、ゼロ・トレランス規定にはなっていない（例えば、EUでも「乳製品の場合は、25g中に検出不可」とされている）。

日本の場合

日本の食品衛生法ではリストeriaに関する具体的な規格・基準は規定されていないが、法の「不衛生食品等の販売等の禁止」の項目を根拠に輸入禁止や回収が行われることがある。

輸入食品の場合は、検疫所の抜き取り検査でリストeriaが検出されれば輸入禁止となる。また、輸入後に輸出国から汚染情報が得られた場合、回収・検査命令が出される。リストeriaに関連して命令回収や自主回収が行われた事例としては、デンマーク産生ハム（2000年）、イタリア産サラミ、米国産ウインナー（2001年）、国内メーカー製生ハム、イタリア産チーズ（2003年）、輸入チーズ（2004年）、フランス産チーズ（2006年）等がある。

ちなみに、わが国の一般消費者のリストeriaに関する認知度は、どの程度のものだろうか。2000年に兵庫県食肉衛生検査所が、一般消費者を対象に「知っている食中毒菌」についてアンケート調査を実施した。その結果「サルモネラ」については回答者の95%が知っていたのに対し「リステ

リア」は6%しか知らなかった。今後、リステリアに関する啓蒙活動を（特に高齢者や妊産婦を中心に）積極的に展開し、ハイリスク食品の喫食回避を促すよう、さまざまな媒体を通じて正しい知識を普及させていく必要があるのではないかと。米国では1996～2000年のアクティブ・サーベイランスにおいて、リステリア症がヒスパニック系に多く、乳幼児や子供を持つ年齢層に多いことが確認されたので、これらの人々を対象にした教育の強化に着手した。

国際機関における取り組み

コーデックス委員会では、2005年に開催された食品衛生部会においてready-to-eat食品におけるリステリアのコントロールについて、食品衛生上の取り扱いに関するガイドラインを提案した（現在もその議論は継続されている）。このガイドラインでは（先に述べた欧州やカナダの規格・基準と同じように）いわゆるゼロ・トレランスではなく、一定菌数までの存在は許容し（例えば1g当

たり100個までの汚染を許容する等）、さらにプラスアルファとして衛生管理に関する要件を盛り込んだ内容になると思われる。

なお、FAO/WHOが2004年に採択したリステリアのリスクアセスメント（最終版）では、リステリア制御の考え方について、①リステリア症はスタンダードを大きく逸脱した多数の病原体を摂取したことにより引き起こされる、②消費段階での高レベルの汚染を阻止することが、リステリア症発生率低下に最も効果がある、③小売段階での高レベル汚染は比較的稀（まれ）であるが、製造～小売を通して菌の増殖が抑制されれば、リスクはさらに減る、④菌の増殖が可能な食品では、適切な温度コントロールと保存期間の制限が重要である——といった内容が記載されている。これが国際的に共通するリステリア制御の基本的な考え方である。（以上）

1枚から発注可能!

安心安全 ユニフォーム



高機能

- コイルファスナー
- インナーネット
- ロング丈
- ラグラン
- メッシュ裏地

低価格

安定供給

FX70740
常服 男女共用
混入だいせらいジャケット

¥1,680

(税込)

FX70748
常服 男性用
混入だいせらいパンツ

¥1,570

(税込)

FX70748
常服 女性用
混入だいせらいパンツ

¥1,570

(税込)

サイズ: S～LL
カラー: 0/011 ホワイト

こんにちは、まだまだ寒い日が続きますね。新商品ユニフォームのご紹介です。このユニフォームは3つの要素で出来ています。「安全」「安心」「安定」です。

安全とは、異物混入防止のための高機能ユニフォームであることです。ウエスト、袖口、裾口にインナーネットを配置。体毛、塵、埃が外に出るのを防止します。1本の線ですでたコイルファスナーを採用し、インナーネットも洗濯耐久のある樹脂ボタンを使っています。

2つめの安心ですが、お客様にとってもリーズナブルなお値段でご提供できます。また、オールシーズン用の生地を採用し、着心地の良さも検討しました。

最後に3つ目の安定ですが、生産工場にゆとりを持たせることで在庫切れによる納期遅延の解消を実現させました。いつでも、1枚からご注文いただけるユニフォームです。

WEB販売もしていますので、1度ホームページに遊びに来てください。お待ちしております。

大特価! お見逃し無く!

ただいま、ホームページにて
アウトレットセールも開催中!!

ホームページ 検索キーワード

混入だいせらい 検索

<http://www.fd-uniform.com/>

おいしさに感謝。UN-3 株式会社サンエス
かんぱりに応援。
マイスター事業部 (資材) 課 室
広島県福山市神辺町川南1019-1 〒720-2192
TEL 084-963-1110 FAX 084-963-2562

Note

Separation of Viable Histamine-Producing Bacteria from Yellowtail Meat Components by Density Gradient Centrifugation

EMIKO ARAKI^{1,2}, KODAI TAKAYAMA², MIKAKO SAITO²,
AND HIDEAKI MATSUOKA^{2*}

¹Japan Food Research Laboratories, 52-1, Motoyoyogi-cho, Shibuya-ku, Tokyo 151-0062, Japan

²Department of Biotechnology and Life Science, Tokyo University of Agriculture and Technology,
2-24-16, Nakacho, Koganei-shi, Tokyo 184-8588, Japan

Received 29 May, 2008/Accepted 27 September, 2008

Quantitative separation of live cells from food samples is essential for non-culture methods to be validated. In this viewpoint, the feasibility of density gradient centrifugation (DGC) was demonstrated for the first time using samples of yellowtail meat to which *Morganella morganii*, a histamine producing bacterium had been added. Using a Ficoll density gradient from 50 to 10 w/v % with 10 w/v % steps, meat-free fractions of *M. morganii* cells were collected in 20-50 w/v % layers. The total cell collection rate ranged from 73-86 % irrespective of the cell density in the range 10^2 - 10^6 cells/200 μ l.

Key words : Density gradient centrifugation/Viable cell separation/Histamine-producing bacteria/Histamine-producing fish/*Morganella morganii*.

The detection of live bacteria in foods is essential to ensure food safety and food security. In particular, to find the cause of bacterial foodborne diseases, the detection of live bacteria from the contaminated food must be carried out quickly. Conventionally, living bacteria have been detected by means of culture, but in recent years non-culture methods such as flow cytometry (Steen, 2000) and microscopic fluorescent imaging have been used as an alternative to the culture method for foods, pharmaceuticals, and cosmetics (Matsuoka et al., 2003; Shimakita et al., 2006). However, these non-culture methods are influenced by various components of food matrices, and therefore those components need to be removed by a proper pretreatment method. Filtration is thought to be a simple and efficient method. In fact, filtration was shown to be effective for various types of food (Shimakita et al., 2006). However, there are many kinds of food that can hardly be filtered. Raw milk, fish meat, and shellfish are typical examples.

In this study, we investigated the applicability of the density gradient centrifugation (DGC) method. This method has been well applied to spermatozoa and intracellular particles. There are also reports of its application to bacteria (Makinoshima et al., 2002; Nayak et al., 2005). However DGC has never been applied to food samples in practical food safety control, because it is too tedious to use DGC in daily routine operations. Therefore it is necessary to find the optimum DGC conditions for a specific food matrix as well as for the future development of a high throughput system for the fractionation of post-DGC samples. This paper describes the feasibility of using DGC from this viewpoint. The first challenge involved the use of yellowtail meat to which a histamine producing bacterium was added.

Histamine poisoning often occurs in fish in the families of *Carangidae* and *Scombridae* including yellowtail. Histamine poisoning is understood to be caused by specific bacteria that contaminate fish meat and produce histidine decarboxylase. Free histidine in fish meat is then converted to histamine, resulting in the accumulation of histamine in the fish

*Corresponding author. Tel : +81-42-388-7029, Fax : +81-42-387-1503, E-mail: mhide@cc.tuat.ac.jp

meat to a level that causes food poisoning. *M. organii*, *Photobacterium damsela* and *P. phosphoreum* are typical examples of histamine-producing bacteria (Allen et al., 2005; Ben-Gigrey et al., 1999; Kanaki et al., 2004; Kim et al., 2001; Morii et al., 2004; Tsai et al., 2005; Fujii, 2006). Among them, *M. organii* was selected as the target bacterium in this study.

Ficoll PM400 (GE Healthcare Bio-Sciences) was sterilized (121°C, 15 min) and dissolved in 50 mM phosphate buffer solution (PB) (pH 7.0) to prepare a 50 w/v % solution. The concentrate was diluted with PB to prepare 10, 20, 30, and 40 w/v % Ficoll solutions. Two hundred microliters of each solution, beginning with the highest concentration, were put into centrifugation tubes (Thinwall Polyallomer, 11 × 34 mm) by using a micropipette to prepare a stepwise gradient. In preparing the gradient, the tube was held upright and the solution was put into the tube carefully not to cause disturbance between Ficoll layers. Each Ficoll solution was refrigerated for storage and the density gradient was prepared before use.

The strain of *M. organii* was provided by T. Fujii, Tokyo University of Marine Science and Technology, and maintained on a TSA plate at 4°C. Before use, *M. organii* was inoculated into 10 ml of the LB medium using a platinum loop, and then cultured in a shaking incubator (130 rpm, 24 h, 37°C). Then 100 µl of the cultured cell suspension was transferred in 10 ml of the LB medium and incubated again in the same manner. The resulting cell suspension was diluted with PB to prepare a test cell suspension containing ca. 10² cells per 100 µl.

Two hundred microliters of the test cell suspension were laid onto the Ficoll density gradient prepared as described above. The test tube was centrifuged using an ultra centrifugation system (BECKMAN Optima™ TLM and TLS-55 Swing bucket rotor) at 30,000 rpm for 20 min at 4°C. After the centrifugation, each layer in the test tube was collected by careful manipulation using a micropipette. A hundred microliter aliquot of each fraction was plated on the plate count agar (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.), and then incubated at 37°C for 18 h. The number of colonies was counted to calculate the number of bacteria in each fraction. As shown in Fig. 1, *M. organii* cells were distributed principally in the 20 w/v % and 30 w/v % Ficoll fractions. The total of 20-50 w/v % layers reached 100 %.

A five gram portion of farmed yellowtail fillet was placed in a stomacher bag, and PB (10 times the volume of the fillet) was added to the bag, and then stomached for 60 s to obtain a fish meat preparation. To the fish meat was added the test cell suspension

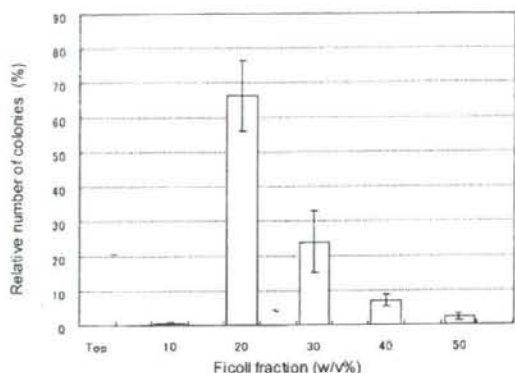


FIG. 1. Distribution of *M. organii* collected after DGC. Sample: 200 µl of *M. organii* suspended in PB (100 cells/100 µl). N=3

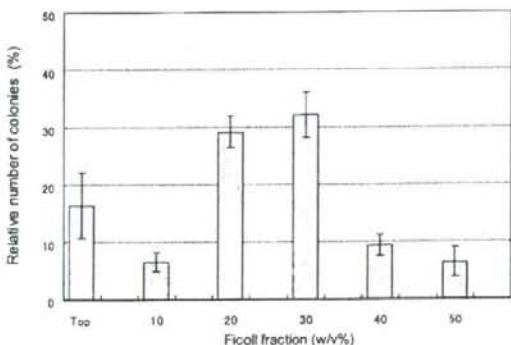


FIG. 2. Distribution of *M. organii* collected after DGC. Sample: 200 µl of *M. organii* added to the yellowtail extract (100 cells/100 µl). N=3

so that the cell concentration was 10² cells per 100 µl. After DGC, the added *M. organii* cells were distributed in every fraction (Fig. 2). Fish meat components were collected in the top layer and 10 w/v % Ficoll layer. Therefore bacterial cells distributed in the 20-50 w/v % Ficoll layers were obtained without disturbance of the fish meat. The total cell collection rate in the 20-50 w/v % Ficoll layers was 78 %. *M. organii* cells were principally collected from the 20 and 30 w/v % Ficoll layers.

It was revealed that the bacterial cells were attached to the fish meat components (Fig. 3). In order to separate these cells from fish meat, Tween 80 was added to PB. As depicted in Fig. 4, the addition of 0.1% Tween 80 solution decreased the cell distribution rate in the top layer to 8 %. Under this condition, the total collection rate from the 20-50 w/v % Ficoll layers reached 86 %.

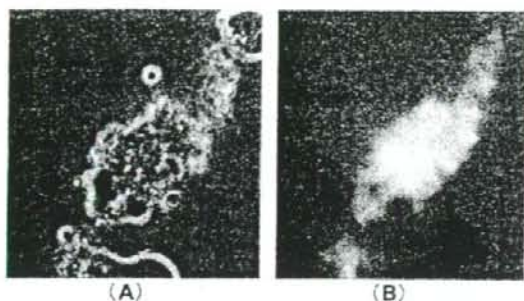


FIG. 3. Fluorescence images of *M. morganii* cells adhering to the yellowtail muscle. Sample: The top layer of Fig. 2. (A) Bright field image, (B) Fluorescence image. The test sample was stained with DAPI.

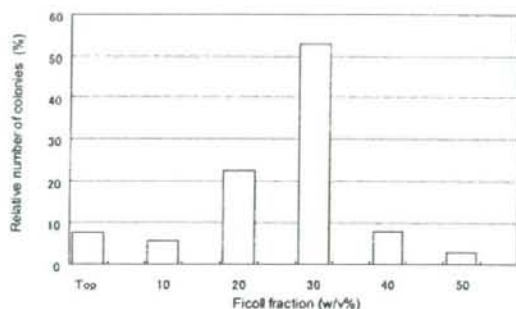
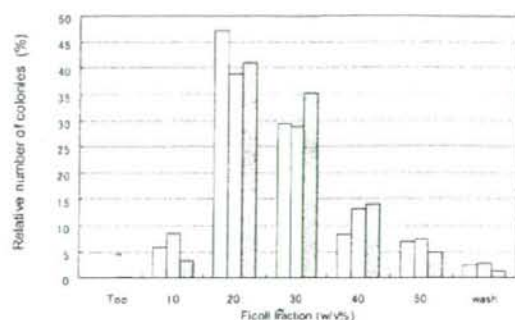
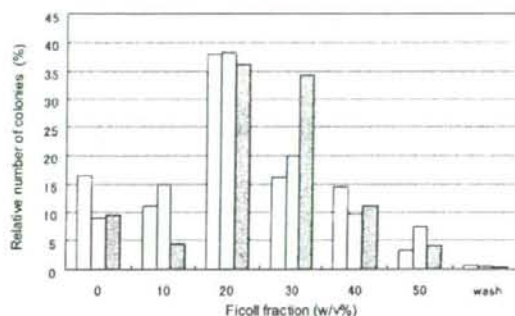


FIG. 4. Distribution of *M. morganii* collected after DGC. Sample: 200 μ l of *M. morganii* added to the yellowtail extract (100 cells/100 μ l) containing 0.1% Tween 80. N=2



(A)



(B)

FIG. 5. Distribution of *M. morganii* collected after DGC. Sample: (A) 200 μ l of *M. morganii* suspended in PB. (B) 200 μ l of *M. morganii* added to the yellowtail extract containing 0.1% Tween 80. Cell density: \square 10^2 , \square 10^4 , \blacksquare 10^6 cells/200 μ l.

The cell distribution after DGC was thought to be influenced by the cell density in the test cell suspension. Thus test suspensions containing 10^2 , 10^4 , and 10^6 cells/200 μ l (=cells/tube) were subjected to DGC with or without fish meat components. Without the fish meat, there was no cell density dependency (Fig. 5(A)). Total distribution rates in the 20-50 w/v % Ficoll layers were 89-96 % irrespective of the cell density from 10^2 to 10^6 cells/200 μ l. Even with the fish meat, the cell density dependency was only slight (Fig. 5(B)). The total distribution rate in the 20-50 w/v % Ficoll layers was 73 % at 10^2 cells/tube, while it was 86 % at 10^6 cells/tube.

The present method has been applied to the cell count in yellowtail during storage at 20°C. Yellowtail (approximately 5 kg in body weight), farmed in Miyazaki prefecture, Japan, were killed by brain piercing in order to retain freshness, and then immediately filleted. Each fillet was washed, vacuum-packed, stored in ice, and then transported. Portions

of muscle (approximately 30 g from each) were taken from the dorsal region, and then packed in polyethylene zip-lock bags. Each bag was then placed in a stomacher bag and the stomacher was turned on for 60 s to smash the fish meat (control group). For the test group, the test cell suspension was added the fish meat at the time of stomaching so that there were 10^5 cells per gram of fish meat. The fish samples in both the test and the control groups were stored at 20 °C in polyethylene zip-lock bags for 15, 20, 39 and 45 h. The fish samples were subjected to DGC and the number of cells was counted for each density fraction. Then total numbers of cells from the 20-50 w/v % Ficoll fractions were plotted versus the storage time. As shown in Fig. 6, the number of cells increased during the storage and reached 10^7 cells/g at 45 h. In the same way, the number of cells in the control samples was measured. It was no greater than 20 cells/g at 0 h but increased markedly and reached the same level as that of the test samples at around 20-30 h.

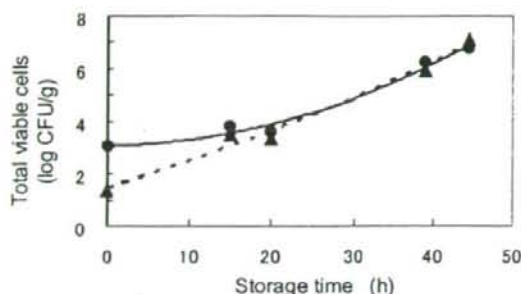


FIG. 6. Growth of *M. morgani* and other bacteria in the yellowtail during storage.

●: Number of *M. morgani* cells in 1g of yellowtail muscle. 10^3 cells/g *M. morgani* was added at $t=0$. Total cell count from the 20–50% Ficoll layers after DGC using Ficoll containing 0.1% Tween 80. ▲: Number of other bacterial cells in 1g of yellowtail muscle. Only the cells naturally contaminating the yellowtail were counted.

At the same time, the amount of histamine in the fish samples was also determined using high-performance liquid chromatography (HPLC) after dansylation. Histamine was found only in the test group, though the number of bacterial cells was the same in both groups. The histamine concentration in the test group was $1210 \mu\text{g/g}$ and $135 \mu\text{g/g}$ at 39 h and 45 h, respectively, while it was below the detectable limit ($5 \mu\text{g/g}$) throughout the test period in the control group. This result confirms that, even in the so-called histamine-producing fish, histamine is not produced if the fish is not contaminated with bacteria that produce histidine decarboxylase.

In the present study, it was important to separate *M. morgani* cells without degrading the cell viability. During centrifugation, bacterial cells should undergo cell-cell collisions frequently. In order to soften these collisions and protect cells from mechanical stress, we thought that the suspending solution had better be viscous. Thus we used Ficoll in the DGC. In the next step, however, it is necessary to investigate the feasibility of less viscous material such as Percoll for a more rapid and easier protocol.

In conclusion, DGC enabled the quantitative separation of the live cells of *M. morgani* from samples of yellowtail meat. The present results should provide essential data for the future design of a high throughput system for the collection of post-DGC samples.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank T. Fujii of Tokyo University of Marine Science

and Technology for providing us the *M. morgani* that was used in this study. This research was partly supported by Grant-in-aid for Scientific Research for the Promotion of Safety and Security of Foods, on the subjects H17-Food-General-003, H18-Food-General-011, and H20-Food-General-011, the Ministry of Health, Labor, and Welfare.

REFERENCES

- Allen, D. G., Jr., Green, D. P., Bolton, G. E., Jaykus, L.-A., and Cope, W. G. (2005) Detection and identification of histamine-producing bacteria associated with harvesting and processing mahimahi and yellowfin tuna. *J. Food Prot.*, **68**, 1676–1682.
- Ben-Gigirey, B., Baptista de S., J.M.V., Villa, T.G., and Barros-Velazquez, J. (1999) Histamine and Cadaverine production by bacteria isolated from fresh and frozen Albacore (*Thunnus alalunga*). *J. Food Prot.*, **62**, 933–939.
- Kanaki, M., Ishibashi, M., Yoda, T., and Tsukamoto, T. (2004) Incidence of halophilic and enteric histamine-producing bacteria in fish samples consisting mainly of scombroid fish. *Jpn. J. Food Microbiol.*, **21**, 216–220.
- Kim, S. H., Field, K. G., Morrissey, M. T., Price, R. J., Wei, C. I., and Haejung, A. (2001) Source and identification of histamine-producing bacteria from fresh and temperature-abused albacore. *J. Food Prot.*, **64**, 1035–1044.
- Makinoshima, H., Nishimura, A., and Ishihama, A. (2002) Fractionation of *Escherichia coli* cell populations at different stages during growth transition to stationary phase. *Molecular microbiology*, **43**, 269–279.
- Matsuoka, H., Oishi, K., Watanabe, M., Kozono, I., Saito, M., and Igimi, S. (2003) Viable cell detection by the combined use of fluorescent glucose and fluorescent glycine. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **67**, 2459–2462.
- Mori, H., and Kasama, K. (2004) Activity of two histidine decarboxylases from *Photobacterium phosphoreum* at different temperatures, pHs, and NaCl concentration. *J. Food Prot.*, **67**, 1736–1742.
- Nayak, B. B., Kamiya, E., Nishino, T., Wada, M., Nishimura, M., and Kogure, K. (2005) Separation of active and inactive fractions from starved culture of *Vibrio parahaemolyticus* by density dependent cell sorting. *FEMS Microbiol. Eco.*, **51**, 179–186.
- Pharmaceutical Society of Japan. 2005. Methods of analysis in health. 180–182.
- Shimakita, T., Tashiro, Y., Katsuya, A., Saito, M., and Matsuoka, H. (2006) Rapid separation and counting of viable microbial cells in food by nonculture method with Bioplorer, a focusing-free microscopic apparatus with a novel cell separation unit. *J. Food Prot.*, **69**, 170–176.
- Steen, H. S. (2000) Flow cytometry of bacteria: glimpses from the past with a view to the future. *J. Microbiol. Methods*, **42**, 65–74.
- Tsai, Y. H., Chang, S. C., Kung, H. F., Wei, C. I., and Hwang, D. F. (2005) Histamine producing by *Enterobacter aerogenes* in sailfish and milkfish at various storage temperatures. *J. Food Prot.*, **68**, 1690–1695.
- Fujii, T. (2006) Scombroid fish poisoning due to histamine-producing bacteria. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **47**, J343–J348.

Genetic Analysis of the Capsid Gene of Genotype GII.2 Noroviruses[†]

Nobuhiro Iritani,^{1,2*} Harry Vennema,¹ J. Joukje Siebenga,¹ Roland J. Siezen,³ Bernadette Renckens,³ Yoshiyuki Seto,⁴ Atsushi Kaida,² and Marion Koopmans¹

Laboratory for Infectious Diseases and Perinatal Screening, National Institute for Public Health and the Environment (RIVM), P.O. Box 1, 3720 BA Bilthoven, The Netherlands¹; Department of Microbiology, Osaka City Institute of Public Health and Environmental Sciences, 8-34 Tojo-cho, Tennoji-ku, Osaka 543-0026, Japan²; Centre for Molecular and Biomolecular Informatics, Radboud University Medical Center, P.O. Box 9101, 6500HB Nijmegen, The Netherlands³; and Laboratory of Microbiology, Osaka Prefecture University, 1-1 Gakuen-cho, Sakai, Osaka 599-8531, Japan⁴

Received 2 November 2007/Accepted 5 May 2008

Noroviruses (NoVs) are considered to be a major cause of acute nonbacterial gastroenteritis in humans. The NoV genus is genetically diverse, and genotype GII.4 has been most commonly identified worldwide in recent years. In this study we analyzed the complete capsid gene of NoV strains belonging to the less prevalent genotype GII.2. We compared a total of 36 complete capsid sequences of GII.2 sequences obtained from the GenBank ($n = 5$) and from outbreaks or sporadic cases that occurred in The Netherlands ($n = 10$) and in Osaka City, Japan ($n = 21$), between 1976 and 2005. Alignment of all capsid sequences did not show fixation of amino acid substitutions over time as an indication for genetic drift. In contrast, when strains previously recognized as recombinants were excluded from the alignment, genetic drift was observed. Substitutions were found at five informative sites (two in the P1 subdomain and three in the P2 subdomain), segregating strains into five genetic groups (1994 to 1997, 1999 to 2000, 2001 to 2003, 2004, and 2005). Only one amino acid position changed consistently between each group (position 345). Homology modeling of the GII.2 capsid protein showed that the five amino acids were located on the surface of the capsid and close to each other at the interface of two monomers. The data suggest that these changes were induced by selective pressure, driving virus evolution. Remarkably, this was observed only for nonrecombinant genomes, suggesting differences in behavior with recombinant strains.

Noroviruses (NoVs) are an important cause of acute nonbacterial gastroenteritis in adults and children worldwide (13). NoVs are members of the family *Caliciviridae*, having a positive-sense single-stranded RNA genome. Their genome is organized into three open reading frames (ORFs). ORF1 encodes nonstructural proteins including the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp), ORF2 encodes a major structural capsid protein including a shell (S) domain and a protruding (P) domain, and ORF3 encodes a minor structural protein (13, 18, 41). The S domain forms the inner part (shell) of the viral capsid, and the P domain forms the arch-like structures that protrude from the virion. The P domain is further divided into P1 and P2 subdomains that correspond to the sides and the top of the arch-like capsomeres, respectively (13, 31).

Based on the genetic analysis of the RdRp and capsid regions, human NoVs can be divided into three genogroups (Gs), GI, GII, and GIV (2, 14, 39), which further segregate into distinct lineages called genotypes (2, 20, 36, 37). Recently, Kageyama et al. (20) proposed that at least 31 genotypes could be distinguished within GI and GII. The GII.4 genotype, which is represented by the Lordsdale/93/UK strain, has been the most commonly identified genotype worldwide in recent years. Genetic characterization of strains belonging to this genotype have shown a sequence of variants that have arisen over time, suggesting that rapid genetic evolution of GII.4 NoVs may in

part explain their successful spread and impact on people of all ages (5, 9, 27, 29, 30, 33, 40).

Viruses belonging to other NoV genotypes are found less consistently, causing sporadic outbreaks or temporary epidemics in a limited geographic region or time period (5, 17, 23, 26). As a result, far less is known about the population structure of these variants (28). The genetic analysis of other genotype NoVs excluding GII.4 will improve our understanding of genetic evolution and its relevance for the epidemiology of NoVs.

During the spring of 2004, an epidemic of GII.2 NoV (which is represented by the Melksham/94/UK strain [Melksham]) occurred in Osaka City, Japan. Our previous study of this regional epidemic described the molecular epidemiology of these GII.2 strains (17). Here, we describe the genetic characterization of GII.2 strains from those outbreaks in comparison with viruses detected over a 12-year period in the GenBank, The Netherlands, and Japan.

MATERIALS AND METHODS

GII.2 strains. A total of 36 NoV strains that had been characterized as GII.2 genotype were used for this study (Table 1). The capsid sequence data for five GII.2 strains were obtained from the GenBank. Of these, the Melksham strain and the Chesterfield/434/1997/US strain (11, 29) have been characterized as belonging to the GII.2 genotype on the basis of RdRp as well as capsid regions. The Snow Mountain/76/US strain has been characterized as a recombinant NoV, with a distinct (non-GII.2) RdRp region and a GII.2 capsid region (4, 16). The other two strains from the GenBank (Ina/02/JP and Buds/02/US) were characterized as GII.2 genotype on the basis of the capsid region, but their sequences of the RdRp region were unknown. The capsid sequence data of Buds/02/US strain lacked the first 6 nucleotides (nt) from the 5' end of the capsid gene. Twenty-one GII.2 strains were obtained from outbreaks or sporadic cases detected in Osaka City, Japan, between April 1996 and March 2005. These were 21

* Corresponding author. Mailing address: Department of Microbiology, Osaka City Institute of Public Health and Environmental Sciences, 8-34 Tojo-cho, Tennoji-ku, Osaka 543-0026, Japan. Phone: 81 6 6771 3147. Fax: 81 6 6772 0676. E-mail: n-iritani@city.osaka.lg.jp.

[†] Published ahead of print on 14 May 2008.

TABLE 1. GII.2 NoV strains used in this study

Source	Strain (abbreviation) ^a	RdRp sequence type ^b	Accession no.	Note ^c
GenBank	Snow Mountain/76/US (SM)	GII-NA	AY134748	
	Melksham/94/UK (Melksham)	GII.2	X81879	
	Chesterfield/434/97/US (CF434)	GII.2	AY054300	
	Ina/02/JP (Ina)	Unknown	AB195225	
	Buds/02/US (Buds)	Unknown	AY660568	
Osaka City, Japan	OC97049/97/JP (97049)	GII-NA	AB279553	O
	OC01243/01/JP (01243)	GII-NA	AB279554	O
	OC02012/02/JP (02012)	GII.2	AB279555	O
	OC02022/02/JP (02022)	GII-NA	AB279556	O
	OCS020289/02/JP (S020289)	GII.b	AB279570	S
	OC04038/04/JP (04038) ^d	GII.2	AB279557	O*
	OC04042/04/JP (04042) ^d	GII.2	AB279558	O*
	OC04043/04/JP (04043) ^d	GII.2	AB279559	O*
	OCS030697/04/JP (S030697) ^d	GII.2	AB279571	S*
	OC04056-1/04/JP (04056-1) ^d	GII.2	AB279560	O*
	OC04056-2/04/JP (04056-2) ^d	GII.2	AB279561	O*
	OC04059/04/JP (04059)	GII.2	AB279562	O*
	OCS040035/04/JP (S040035)	GII.2	AB279572	S*
	OC04067/04/JP (04067) ^d	GII.2	AB279563	O*
	OC04071/04/JP (04071)	GII.2	AB279564	O*
	OC04073/04/JP (04073)	GII.2	AB279565	O*
	OC04075/04/JP (04075)	GII.2	AB279566	O*
	OC04076/04/JP (04076) ^d	GII.2	AB279567	O*
	OCS040100/04/JP (S040100)	GII.2	AB279573	S*
	OC04169/04/JP (04169)	GII-NA	AB279568	O
	OC05010/05/JP (05010)	GII.b	AB279569	O
The Netherlands	Sensor99-191/99/NL (S99-191)	GII.2	AB281081	S
	OB0037-246/00/NL (OB0037)	GII.2	AB281082	O
	OB0048-318/00/NL (OB0048)	GII.2	AB281083	S
	OB0115-195/01/NL (OB0115)	GII.2	AB281084	O
	EP0125-006/01/NL (EP0125)	GII.2	AB281085	O
	EP0207-001/02/NL (EP0207)	GII.2	AB281086	O
	EP0239-001/02/NL (EP0239)	GII.2	AB281087	O
	OB0371-459/03/NL (OB0371)	GII.2	AB281088	O
	OB0528-158/05/NL (OB0528)	GII.2	AB281089	O
	OB0587-470/05/NL (OB0587)	GII.2	AB281090	O

^a NoV strains are arranged in chronology of detection from top (oldest) to bottom (most recent) for each source.^b NA, not assigned.^c O, outbreak; S, sporadic case; *, spring epidemic in 2004.^d These strains have identical amino acid sequences in the complete capsid gene and only one strain (OC04038/04/JP) has been used for long-term genetic analysis.

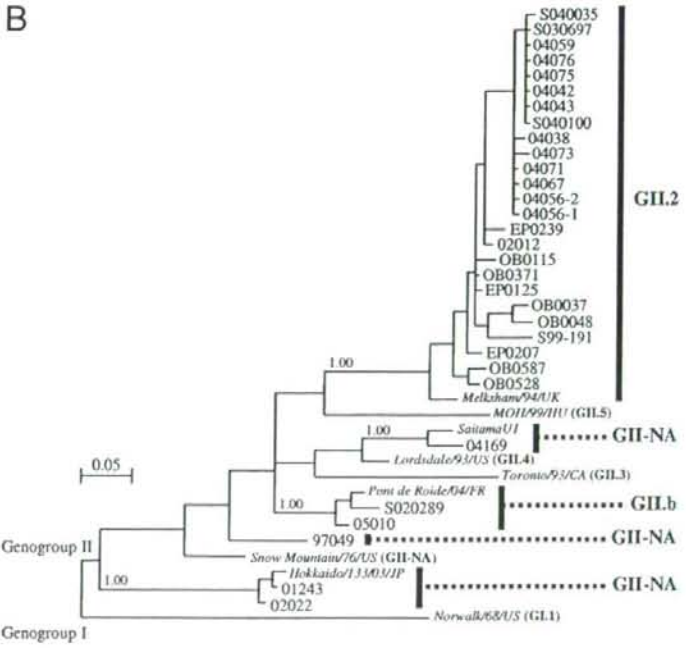
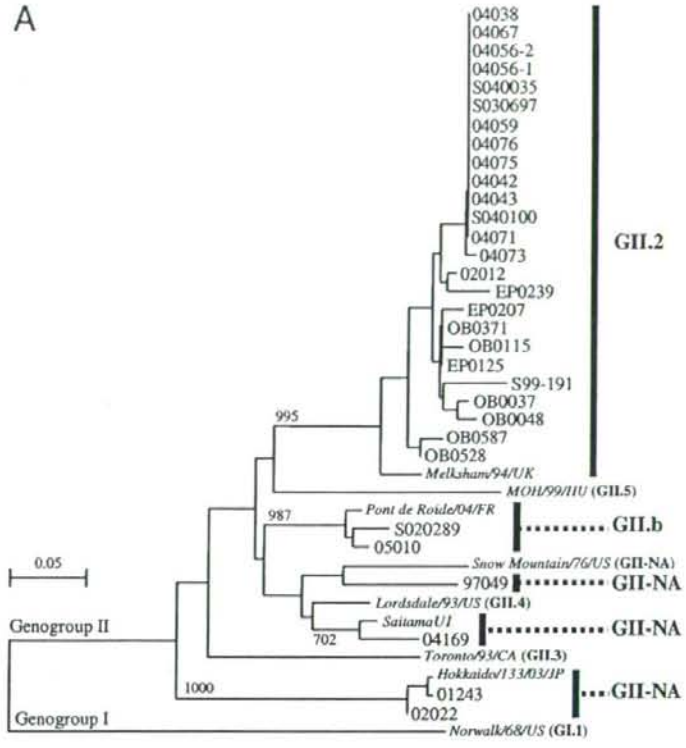
of the 23 GII.2 strains identified during a 9-year study period out of a total of 238 outbreaks and 200 sporadic cases of NoV infection. From the genetic analysis across the junction between the RdRp and the capsid regions, 6 of these 21 GII.2 strains have been characterized as recombinants, which have non-GII.2 RdRp regions and GII.2 capsid regions (Fig. 1) (17).

The strains from The Netherlands were collected from a 12-year study period. Between 1994 and 2005, GII.2 NoVs were detected in 13 (1.7%) out of 745 NoV-associated outbreaks and three sporadic cases in The Netherlands. Initially, these GII.2 NoVs were characterized by the comparison of sequences in the RdRp region (Fig. 1). The detection method and criteria for genotyping at the RdRp region have been previously described (8, 36). The complete capsid genes of 10 strains from eight outbreaks and two sporadic cases were amplified by reverse transcription-PCR (RT-PCR) and were used for this analysis.

Amplification and sequencing for the complete capsid gene of GII.2 strains. Viral RNA was extracted from stool suspensions by using a QIAamp viral RNA Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany). RT-PCR was carried out with the reaction mixtures and enzymes as previously described (8). RT was performed at 42°C for 2 to 3 h with reverse primer, N235Rex (17), and enzyme was inactivated at 95°C for 5 min. PCR was performed using several pairs of PCR primers (Table 2) with a GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA) under the following conditions: denaturation at 95°C for 1 min; 40 cycles of 95°C for 15 s, 50°C for 30 s, and 72°C for 1 min; and a final cycle of incubation at 72°C for 5 min. When a PCR failed to produce strong products, we performed nested PCR. The amplified fragments were sequenced directly with a Big Dye terminator cycle

sequencing kit and ABI 3700 sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA). The nucleotide sequences were determined in both orientations using the PCR primers. DNA sequences were edited using SeqManII (DNASTAR Inc., Konstanz, Germany).

Sequence analysis. Nucleotide or amino acid sequence alignments were performed with BioEdit (version 7.0.52) (15), Clustal X (version 1.81) (35), or MUSCLE (version 3.51) (10). The extraction of the informative sites from nucleotide or amino acid sequence alignments was performed with ProSeq (version 2.91) (12). The rate of change for different domains was compared using chi-square statistics. In this analysis, a site was designated as an informative site when at least two strains had an identical amino acid in the alignment that differed from the other sequences. A phylogenetic tree with 1,000 bootstrap replications was constructed by the neighbor-joining method, and the genetic distances were calculated according to the Kimura two-parameter method (21). We performed additional phylogenetic analysis by the Bayesian method using MrBayes (version 3.1.2) (32). Location of specific domains of the GII.2 NoV capsid gene was done according to Chen et al. (7). For computational predictions of the structure of the GII.2 NoV capsid protein, we used the X-ray crystal structures of the capsid protein of Norwalk/68/US (GI.1 genotype, Protein Data Bank identifier [PDB ID] 1IHM, consisting of a complete trimer) (31) and VA387/98/US (GII.4 genotype, PDB ID 2OBR, consisting of only a monomeric P domain) (6) as templates to build homology models. The sequence alignments for the structure and the three-dimensional (3D) models for GII.2 NoV capsid proteins were made by using the WHAT IF program (38) and the 3D-Jigsaw (3)



Downloaded from jvi.asm.org by Shunji Kozaki on October 12, 2008

TABLE 2. Primers used to amplify the capsid gene of GII.2 NoV strains

Primer	Sequence (5' to 3') ^a	Polarity	Location (nt)	Reference or source
COG2F	CARGARBCNATGTTTAYAGRTGGATGAG	+	5003 ^b	19
G2SKF	CNTGGGAGGGCGATCGCAA	+	5058 ^b	22
G2SKR	CCRCNGCATRHCCRTTTRTACAT	-	5401 ^b	22
N235Rex	GCWANRAAGCTCCWGCCAT	-	6273 ^b	17
MKcap508-524F	CAGAAAGATGATCCCAA	+	508 ^c	This study
MKcap524-508R	TTGGGATCATCTTTCTG	-	524 ^c	This study
MKcap662-649R	TCCACTGTTGGTGG	-	662 ^c	This study
MKcap1109-1125F	TGGGTCAGATTCAAATT	+	1109 ^c	This study
MKcap1125-1109R	AATTGTAATCTGACCCA	-	1125 ^c	This study
MKcap1304-1290R	AAGAGCAGGCGCTCC	-	1304 ^c	This study
MK35R	CAAAAGCTCCAGCCAT	-	1644 ^c	This study

^a Abbreviations for residues in boldface are as follows: B, not A; H, not G. In addition, N is A, C, G, or T; R is A or G; W is A or T; Y is C or T.

^b Location of the 5' end of the primer corresponding to the nucleotide position of Lordsdale/93/UK (X86557).

^c Location of the 5' end of the primer corresponding to the nucleotide position of ORF2 and ORF3 of Melksham/94/UK (X81879).

and EasyPred3D (25) servers. WHAT IF could not model residues 342, 344, and 345 based on the Norwalk/68/US capsid protein template (PDB ID 1IHM); as they are present in an inserted loop of the P2 subdomain relative to the template structure, but they are predicted to be in the same position as in the 3D model based on the GII.4 genotype capsid protein template (PDB ID 2OBR). A dimer of the GII.2 NoV capsid protein was modeled by superimposing two predicted monomers onto the trimeric template of the Norwalk/68/US capsid protein. The 3D models were visualized by the YASARA view program (version 6.813, <http://www.yasara.org/>) (24).

Nucleotide sequence accession numbers. The nucleotide sequences determined in this study have been deposited in the DDBJ/EMBL/GenBank with the accession numbers AB281081 to AB281090 (Table 1).

RESULTS

Capsid gene sequence analysis of GII.2 strains collected over 30 years. Sequence data from a total of 36 GII.2 strains showed that the capsid gene was 1,629 nt long and coded for a protein of 542 amino acids. There were no deletions or insertions in the capsid gene among these strains collected over a 30-year period. Sequence comparison showed $\geq 83.6\%$ nucleotide and $\geq 93.5\%$ amino acid identities among these GII.2 strains. The phylogenetic tree based on the 1,629 nucleotide sequences of the complete capsid gene confirmed that all strains were characterized as GII.2 genotype (Fig. 2).

Genetic analysis of GII.2 strains from a regional outbreak in Japan in the spring of 2004. Of the 21 GII.2 strains detected in Osaka City, Japan, 14 strains were detected in samples from cases in outbreaks or sporadic cases in the spring epidemic between March and May 2004 (Table 1). These strains were closely related to each other ($\geq 99.2\%$ nucleotide and $\geq 99.1\%$ amino acid identities). To find out if these viruses changed genetically during circulation in the community for a short period of time (about 3 months), the complete nucleotide and amino acid sequences of the capsid gene from these 14 GII.2 strains were compared. A total of 45 nucleotide substitutions

were observed (Table 3). The majority were third-base position changes (77.8%) and synonymous substitutions (82.2%). These nucleotide changes resulted in amino acid changes in eight codons, five of which were located in the P2 subdomain. In the alignment of the spring epidemic strains over the 3-month period, of the 45 nucleotide substitutions, only one nucleotide position was fixed (nt 594 in the S domain) at the end of this epidemic. This did not result in an amino acid change. All amino acid changes were sporadic. Eight of the 14 strains had an identical amino acid sequences (Table 1). Of these, strain 04038 was used for further genetic analysis.

Genetic analysis of all GII.2 strains collected between 1976 and 2005. The nucleotide and amino acid sequences of the complete capsid genes were compared for 29 GII.2 strains collected between 1975 and 2005 (30 years), excluding 7 GII.2 strains detected in Osaka City with identical amino acid sequences (10 strains from The Netherlands, 14 from Osaka City, and 5 from GenBank). A total of 488 nucleotide changes were observed (Table 4). Again, the majority of these were third-base changes (83.8%) and synonymous (85.9%). In total, 59 nucleotide changes resulted in amino acid changes (34 in the P2 subdomain) (Table 4). Twenty-five of these were informative changes (19 in the P2 subdomain), but none appeared to be fixed in the genome over time. Of the 25 informative sites, the amino acid position 345 was the most variable (Fig. 3). Nevertheless, statistical analysis showed a significantly higher rate of mutation in the P2 subdomain than in P1 and S, suggesting selective pressure ($P = 0.0018$, chi-square 5.63; and $P < 0.0001$, chi-square 12.9).

Genetic analysis of Melksham-like strains detected between 1994 and 2005. In order to understand the apparent discrepancy between selective changes in the P2 subdomain and the absence of fixation of these mutations, we repeated our anal-

FIG. 1. Phylogenetic analysis of partial RdRp gene sequences of GII.2 NoV strains by the neighbor-joining method (A) and the Bayesian method (B). The genotypes at the RdRp regions that are not assigned numbers are represented as GII-NA. The scale indicates the number of substitutions per site. Reference strains of NoV used in this analysis are given in italics. (A) The bootstrap values are indicated on each branch. (B) Tree topology was evaluated on the basis of 1,500,000 generations. The posterior probabilities are indicated on each branch (≥ 0.95 of the posterior probability means that the branch has high credibility). The GenBank accession numbers of the additional reference strains used in this analysis are as follows: Hokkaido/133/03/JP, AB212306; Lordsdale/93/UK, X86557; MOH/99/HU, AF397256; Norwalk/68/US, M87661; Pont de Roide 673/04/FR, AY682549; Saitama U1, AB039775; Toronto/93/CA, U02030. For strain abbreviations, see Table 1.

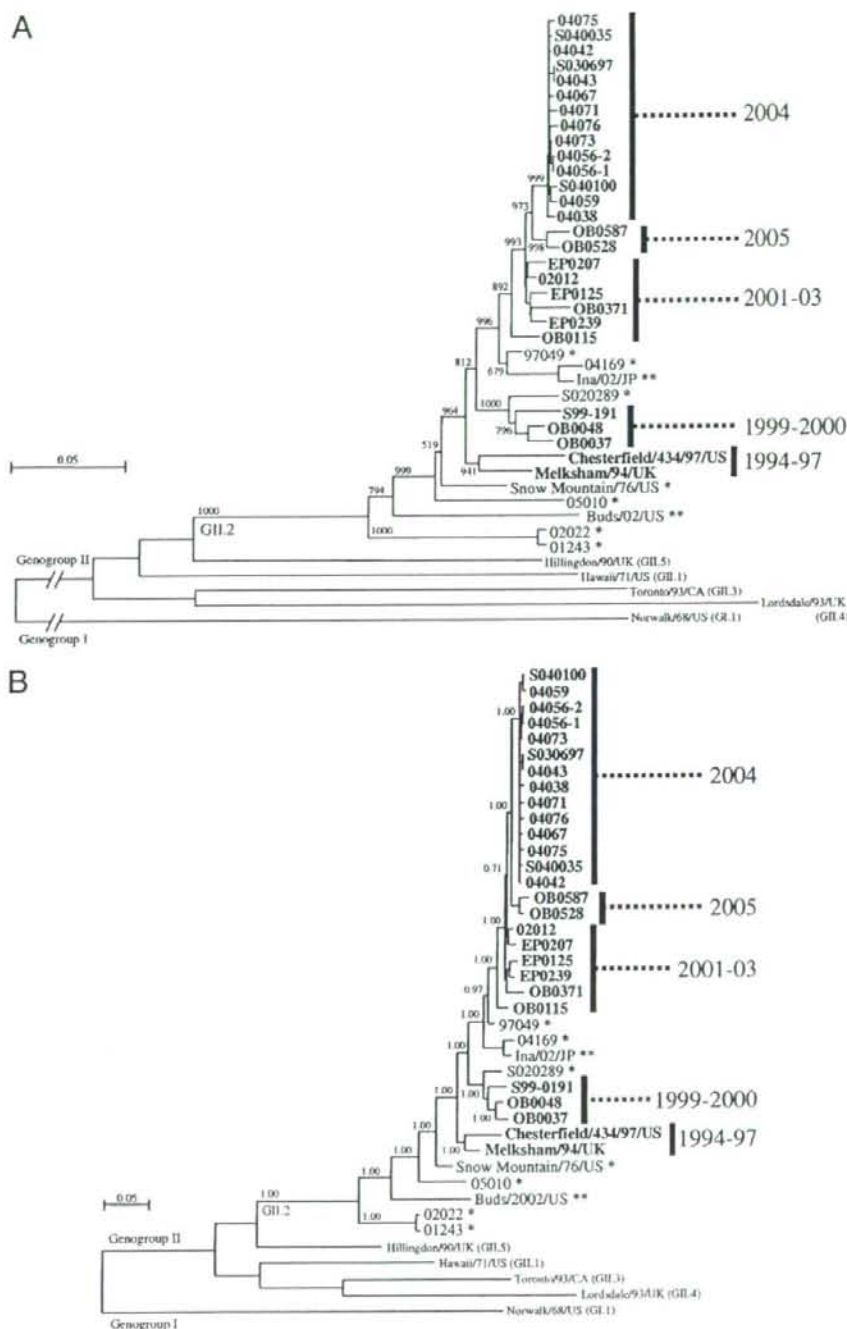


FIG. 2. Phylogenetic analysis of complete capsid gene sequences of GII.2 NoV strains by the neighbor-joining method (A) and the Bayesian method (B). Melksham-like strains, which have a matching (GII.2) RdRp sequence, are shown in boldface. Asterisks indicate the GII.2 strains that have different (*) or unknown (**) genotypes in the RdRp region. The scale indicates the number of substitutions per site. (A) The bootstrap values are indicated on each branch. (B) Tree topology was evaluated on the basis of 500,000 generations. The posterior probabilities are indicated on each branch. The GenBank accession numbers of the additional reference strains used in this analysis are as follows: Hawaii/71/US, U07611; Hillingdon/90/UK, AJ277607; Lordsdale/93/UK, X86557; Norwalk/68/US, M87661; Toronto/93/CA, U02030. For strain abbreviations, see Table 1.

TABLE 3. The numbers of nucleotide and amino acid substitutions in the complete capsid gene among 14 GII.2 strains detected in the spring epidemic of 2004 in Osaka City, Japan

Domain or subdomain ^a	Nucleotide substitutions					Amino acid substitutions		
	No. of substitutions	No. at the indicated position of the changed codon			Synonymous changes (no.)	Nonsynonymous changes (no.)	No. of substitutions	Informative changes (no.)
		1st	2nd	3rd				
N	1	0	0	1	1	0	0	0
S	18	3	2	13	16	2	2	0
P1	7	0	0	7	6	1	1	0
P1-1	4	0	0	4	4	0	0	0
P1-2	3	0	0	3	2	1	1	0
P2	19	3	2	14	14	5	5	0
Total	45	6	4	35	37	8	8	0

^a Each domain of GII.2 NoV capsid gene was determined according to Chen et al. (7). The region and abbreviation of each domain are as follows: N, 5' end of ORF2 and N terminal domain (residues 1 to 45); S, shell domain (residues 46 to 216); P1, P1 subdomain (P1-1, residues 217 to 274; P1-2, residues 421 to 542); P2, P2 subdomain (residues 275 to 420).

ysis after removing recombinant genomes from the alignment (Table 5) (nucleotide and amino acid sequences of the complete capsid gene from 20 Melksham-like strains: 10 strains from The Netherlands, 8 from Osaka City, and 2 from GenBank). Sequence comparison showed $\geq 91.5\%$ nucleotide and $\geq 97.4\%$ amino acid identities among these Melksham-like strains. A total of 301 nucleotide changes were observed (Table 5), the majority of which were third-base changes (87%) and synonymous (88.7%). These nucleotide changes resulted in amino acid changes in 32 codons, half of which were located in the P2 subdomain. Twelve of 32 amino acid positions were informative (9 in the P2 subdomain) (Fig. 3). In contrast with the previous finding, several mutations were fixed: of the 12 informative sites, 2 amino acid substitutions (amino acid positions 245 and 440) in the P1 subdomain and 3 amino acid substitutions (amino acid positions 342, 344, and 345) in P2

subdomain were cumulative (Table 6), segregating the strains into five genetic groups (1994 to 1997, 1999 to 2000, 2001 to 2003, 2004, and 2005) by the neighbor-joining method (Fig. 2A) and Bayesian method (Fig. 2B). The strains detected in the spring epidemic in Osaka City had a unique sequence, with S or P residues at amino acid position 364 (Fig. 3 and Table 6). The other six informative sites were not fixed.

The 3D structure of the P domain of a monomer of the NoV capsid protein was predicted by WHAT IF, 3D-Jigsaw, and EsyPred3D, based on the known 3D structure of the VA387/98/US GII.4 genotype capsid protein, which has 55% amino acid sequence identity in the P domain to the Melksham capsid protein. A comparison of the positions of the six fixed mutations to the predicted 3D structure indicated that all six residues were predicted to be located at the surface of the capsid protein, with three residues (342, 344, and 345) close to each

TABLE 4. The numbers of nucleotide and amino acid substitutions in the complete capsid gene among 29 GII.2 strains collected in the GenBank, The Netherlands, and Japan over a 30-year period

Domain or subdomain ^a	Nucleotide substitutions					Amino acid substitutions		
	No. of substitutions	No. at the indicated position of the changed codon			Synonymous changes (no.)	Nonsynonymous changes (no.)	No. of substitutions	Informative changes (no.)
		1st	2nd	3rd				
N	20	0	2	18	17	3	3	1
S	137	9	3	125	131	6	6	1
P1	162	17	7	138	143	19	16	4
P1-1	53	4	2	47	49	4	3	2
P1-2	109	13	5	91	94	15	13	2
P2	169	28	13	128	128	41	34	19
Total	488	54	25	409	419	69	59	25

^a See note to Table 3.

