

表3. 輸入生鮮魚介類における産地別のノロウイルスおよびA型肝炎ウイルス汚染状況(2006年4月~2009年2月)

産地	検体数	ノロウイルス											A型肝炎ウイルス			
		陽性数	陽性率	GIリアルタイムPCR		GIIリアルタイムPCR		リアルタイムPCR GIとGII陽性例			RT-PCR			遺伝子型*	リアルタイムPCR	RT-PCR
				1<~<10	10≦	1<~<10	10≦	GI+GII			GI	GII	GI+GII			
								GI & GII : 1<~<10	GI or GII : 1<~<10	GI & GII : 10≦						
中国	305	53	17.4%	7	1	20	13	3	4	0	10	31	7	GI/2(1), GI/4(3), GI/5(1), GI/7(2), GI/8(1), GI/10(1), GI/C23(3), GI/C25(4), GI/C26(1), GI/C36(3), GI/ND(3), GI/1(8), GI/2(3), GI/3(2), GI/4(18), GI/6(1), GI/8(2), GI/12(1), GI/YUR(1), GI/swine(1), GI/ND(3)	1	1
韓国	247	37	15.0%	2	0	13	14	0	1	0	7	24	2	GI/4(2), GI/12(1), GI/C23(3), GI/C25(1), GI/C36(4), GI/1(2), GI/2(3), GI/4(13), GI/6(1), GI/8(1), GI/12(1), GI/13(1), GI/16(2), GI/遺伝子型混合(1), GI/ND(5)	0	0
アメリカ	47	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
オーストラリア	38	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
フィリピン	31	5	16.1%	1	0	3	0	0	0	0	1	4	0	GI/2(1), GI/4(2), GI/ND(2)	1	2
ロシア	17	2	11.8%	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	GI/10(1), GI/13(1)	0	0
ベトナム	14	6	42.9%	0	1	0	1	0	0	2	2	1	3	GI/3(1), GI/4(2), GI/4(1), GI/14(2)	0/1	0/1
アイルランド	8	1	12.5%	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	GI/3(1)	0	0
タイ	4	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
北朝鮮	3	1	33.3%	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	GI/5(1)	0	0
イギリス	3	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
インドネシア	2	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		1	0
ニュージーランド	1	1	100%	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	GI/2(1)	0	0
マレーシア	1	1	100%	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0		0	0
チリ	1	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
台湾	1	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
計	723	107	14.8%	10	2	36	29	3	5	2	21	64	12	GI/2(1), GI/3(1), GI/4(8), GI/5(1), GI/7(2), GI/8(1), GI/10(2), GI/12(1), GI/C23(6), GI/C25(5), GI/C26(1), GI/C36(7), GI/ND(3), GI/1(10), GI/2(7), GI/3(4), GI/4(33), GI/5(1), GI/6(2), GI/8(3), GI/12(2), GI/13(2), GI/14(2), GI/16(2), GI/YUR(1), GI/swine(1), GI/遺伝子型混合(1), GI/ND(10)	3/710	3/710

* ND: Not done. 遺伝子型混合: 複数遺伝子型が存在のため解析不能。

C23: NV/korea/C23/00/JP [AY356543]類似株, C25: NV/korea/C25/01/JP [AY356545]類似株, C26: NV/korea/C26/02/JP [AY356546]類似株, C36: Norovirus NV/kangaswa/C36/04/JP [AY641760]類似株, YURI: YURJ[AB083780]類似株, swine: Norovirus swine/GI/OH-QW101.03/US[AY823304]類似株

表4. 動物別の生肉におけるE型肝炎ウイルスの汚染状況（2006年6月～2008年11月）

種類	検体数	HEV	
		リアルタイムPCR	RT-PCR
豚肉	224	0	0
牛肉	16	0	0
牛・豚肉（挽肉）	1	0	0
鹿肉	11	0	0
羊肉	9	0	0
馬肉	3	0	0
計	264	0	0

表5. 国別の動物生肉におけるE型肝炎ウイルスの汚染状況（2006年6月～2008年11月）

国	検体数	HEV	
		リアルタイムPCR	RT-PCR
アメリカ	90	0	0
カナダ	61	0	0
オーストラリア	22	0	0
デンマーク	20	0	0
メキシコ	18	0	0
ニュージーランド	15	0	0
フランス	11	0	0
チリ	7	0	0
スペイン	6	0	0
ハンガリー	3	0	0
中国	3	0	0
イタリア	2	0	0
フィンランド	2	0	0
ブラジル	2	0	0
オーストリア	1	0	0
オランダ	1	0	0
計	264	0	0

II

輸入生鮮魚介類および動物生肉の 取り扱いマニュアル

輸入生鮮魚介類および動物生肉の取り扱いマニュアル

生鮮魚介類のうち二枚貝の15%程度にノロウイルスが、0.4%程度にA型肝炎ウイルスに汚染されている。

実際に、ノロウイルスによる食中毒事件は刺身、寿司あるいは生鮮魚介類を介してと推察されるものが多発している。また、A型肝炎ウイルスによる食中毒事件は寿司店および生鮮魚介類を扱っている調理従業員が感染し、その感染者が調理する際に食材にA型肝炎ウイルスを付着させることにより起きている。

そこで、本研究で得られた成果を基に、生鮮魚介類および動物生肉の取り扱いマニュアルを作成し、食中毒の発生防止に広く利用していただければと願っている。

輸入生鮮魚介類は、市場に出回る前に検査を実施し、ウイルス汚染のないことが確認された国から食品を輸入することが理想であるが、現実的には事前検査が不可能であり、ウイルスの存在しない国もほとんど無い。従って、生鮮魚介類はウイルスに汚染されているものとしてとして取り扱うことである。

輸入動物生肉、特にブタ肉を主とするE型肝炎ウイルスの検査では感染性を有するウイルスは検出されなかった。このことから輸入動物生肉は安全であると考えられたものの、検査したのは極1部であり、全てが安全であるとは言い切れないのが現状であり、国内産のブタ、イノシシ肉からE型肝炎ウイルスが検出されており、これらの食材でもウイルス汚染があるものとして取り扱うことが、感染防止に重要である。

従って、生鮮魚介類はウイルスに汚染されているものとしてとして取り扱うことである。

二枚貝のウイルス汚染部位

二枚貝の中腸腺がノロウイルスに汚染されているものは貝類が吐き出した液中にウイルスが存在していることが多い。さらに中腸腺がノロウイルス汚染された貝類は殻の表面にもウイルスが付着していると考え、取り扱うことが感染防止の上から重要である。また、活かしとして、海水パックされたカキ、ハマグリ、アサリ等においても中腸腺にウイルスが存在するときには活かし中の貝類が海水を吸引・排出する際に、中腸腺のウイルスが海水中に排出され、パック詰めされた海水もウイルスに汚染される。

動物肉では肉汁もウイルスが存在していることがあり、肉汁も汚染しているものとしてとり扱う。

生鮮魚介類の取り扱いについて

輸送時注意：

輸送時には貝および動物肉からの液が漏出しなく、且つ破損しない容器で輸送すること。

輸送時に容器に漏出した液および容器はウイルスが存在するものとして、次亜塩素酸ナトリウム(1,000ppm)で消毒する。

二枚貝の中腸腺がノロウイルスに汚染されているものは貝類が吐き出した液中にウイルスが存在していることが多い。さらに中腸腺がノロウイルス汚染された貝類は殻の表面にもウイルスが付着している確率が高い。

また、活かしとして、海水バックされたカキ、ハマグリ、アサリ等においても、活かしに用いた水も、ウイルスが存在するものとして、水と等量の 2,000ppm の次亜塩素酸ナトリウムで消毒を行う。

動物の肉汁も同様に扱い、処理を行う。

調理時：

生鮮魚介類および動物肉の保存は蓋付きの液が漏れない容器で、10℃以下で保存し、他の食材、特に非加熱食材との交差汚染防止を行うこと。食品を汚染する可能性があるため、専用とすることが望ましい。

動物肉、冷凍されたエビなどの解凍する際には室温解凍はしないこと。

調理者は水を通さないビニール製あるいはゴム製のエプロン、マスク、手袋を着用すること。

生鮮魚介類および動物肉の調理は最後に行うこと。その際に調理器具(まな板、包丁等)は他の食材のものとは別のもので、専用のものを用いる。

生鮮魚介類、動物生肉と非加熱調理を行った食品を混同して取り扱わないようにする。

貝類の殻付きのものを洗うときには、貝類の中腸腺が汚染されているときには殻にもウイルスが付着していることが多いので、洗った液が周りに飛び散らないように注意深く行う。動物肉を洗うときにも、血等にもウイルスが付着していることがあるので、科いると同様に洗う。

貝柱、ヒモなど、身の一部を取り扱う場合は、なるべく中腸腺を傷つけないよう注意を怠るとともに、喫食部分は流水で十分に洗浄する。なお、流水が非加熱食品あるいは食器等に付かないようにする。

アカガイ、トリガイ等で、中腸腺を取り除く際には中腸腺の無い溶液、中腸腺で、調理場を汚さないように、金属製の容器に確実に廃棄する。

調理後：

取り除いた中腸腺および内容液で汚染された調理器具は流水で十分に洗い流してから洗浄後、1,000ppm の次亜塩素酸で消毒を行う。

赤貝の蝶（身）、トリガイ等の中腸腺を取り除いたものは、中腸腺部分を完全に取除き、流水で十分に洗浄してから提供する。

エビ類では調理前に腸官（背わた）を完全に取除く。取り除いた腸管は貝類の中腸腺と同様に取扱い、消毒を行う。

動物肉についても二枚貝と同様に行う。

生鮮魚介類、動物生肉の調理に使用した器具等は十分に洗浄後、200ppm の次亜塩素酸で消毒を実施する。

生鮮魚介類、動物生肉の調理に従事した者は、手指の洗浄を徹底して行い、アルコール消毒を徹底する。

また、他の食品の調理に従事する場合は、手袋、マスク、エプロンは取り替え、手指の洗浄・消毒を徹底しておこなう。

加熱調理：

加熱用の生鮮魚介類は十分な加熱（中心温度が 85℃で 1 分以上、70℃で 5 分以上。）を行う。時に加熱用の生鮮魚介類を生食することが見られるが、このようなことは絶対に避ける。動物肉もウイルスだけでなく細菌や寄生虫感染のおそれがあるため、生食を避け、中心部まで十分に加熱し喫食すること。

シジミの醤油漬や老酒漬は加熱不十分であり、過去のこれら食品による食中毒事件も発生していることから、同様に十分な加熱が必要である。

調理従事者のワクチン

A 型肝炎ウイルスによる食中毒事件は生鮮魚介類を取扱い者によって起きており、A型肝炎ウイルスには有効なワクチンがあるので、魚介類の調理に従事する者は自らが患者、感染源とならないために、ワクチンの接種を積極的に受けることである。

動物生肉の取扱いについて

動物生肉を取り扱うシンクや器具類は専用とし、他の食品を取り扱うものとは区別する。

生食用カキのノロウイルスの自主検査の推奨

生食用カキを輸入する場合は、ノロウイルス、A型肝炎ウイルスの自主検査を定期的実施し、陰性であることを確認することが望ましい。また、販売前に自主検査を行い、ノロウイルスの汚染が無いことを確かめる。

参考

食品、添加物等の規格基準の概要

1 生食用カキの基準

(1)成分規格基準

- ①細菌数：50,000/g 以下
- ②E.Coli 最確数：230/100g 以下、

(2)加工基準

- ①採取海域の海水の大腸菌群最確数 70/100ml 以下
- ②一時貯蔵の基準：大腸菌群最確数 70/100ml 以下の海水
- ③水揚げ後の衛生的な水による洗浄
- ④衛生的な加工施設
- ⑤加工時に添加物の不使用（次亜塩素酸ナトリウムを除く）
- ⑥むき身作業の使用水：飲用適、殺菌海水
- ⑦むき身器具の衛生
- ⑧むき身の洗浄水：飲用適、殺菌海水
- ⑨生食用冷凍カキ：加工後速やかに凍結

(3)保存基準

- ①生食用カキ：10℃以下
- ②生食用冷凍カキ：-15℃以下
- ③衛生的な容器による包装又は保存

2 生食用鮮魚介類

切り身又はむき身にした鮮魚介類（生カキを除く）で生食用のもの（凍結品を除く）

(1)成分規格基準：腸炎ビブリオ最確数：100/g 以下

(2)加工基準

- ①加工に使用する水は飲用適の水又は海水、殺菌海水
- ②原料用鮮魚介類は鮮度が良好なもの
- ③原料用鮮魚介類が凍結されたものである場合、解凍は衛生的な場所又は清潔な水槽で飲用適の水又は海水、殺菌海水を使用
- ④衛生的な場所で加工
- ⑤加工時に添加物の不使用（次亜塩素酸ナトリウムを除く）
- ⑥加工に使用する器具の衛生

(3)保存基準

- ①10℃以下で保存
- ②衛生的な容器に保存

3 冷凍食品

生食用冷凍鮮魚介類

切り身又はむき身にした鮮魚介類（生カキを除く）で容器包装に入れられたもの。

(1)成分規格基準

- ①細菌数：100000/g 以下、大腸菌群陰性
- ②腸炎ビブリオ最確数：100/g 以下

(2)加工基準（生食用冷凍鮮魚介類に限る）

- ①原料用鮮魚介類は鮮度が良好なもの
- ②加工に使用する水は飲用適の水又は海水、殺菌海水を使用、
- ③原料用鮮魚介類が凍結されたものである場合、解凍は衛生的な場所又は清潔な水槽で飲用適の水又は海水、殺菌海水を使用
- ④衛生的な場所で加工
- ⑤加工時に添加物の不使用（次亜塩素酸ナトリウムを除く）
- ⑥加工に使用する器具の衛生
- ⑦加工後速やかに凍結する。

(3)保存基準

- ①-15℃以下で保存
- ②衛生的な容器に保存

III

研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
西尾治	ノロウイルスの知識と感染予防	丸山務	ノロウイルス現場対策改訂版	幸書房	東京	2007	23-70
西尾治	Q&A	丸山務	ノロウイルス現場対策改訂版	幸書房	東京	2007	139-154
西尾治, 古田太郎			現代社会の脅威 ノロウイルス	幸書房	東京	2008	1-254
西尾治	カキを主とする二枚貝におけるノロウイルス食中毒	食の安全研究センター設立記念シンポジウム組織委員会	食の安全を担う科学研究の新たな展開	三協社	東京	2007	55-65
西尾治	ノロウイルス	渡邊昌, 和田功 (総監修)	「病気予防」百科	日本医療企画	東京	2007	1036-1037

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nakagawa-Okamoto R, Arita-Nishida T, Toda S, Kato H, Iwata H, Akiyama M, Nishio O, Kimura H, Noda M, Takeda N, Oka T	Detection of multiple sapovirus genotypes and genogroups in oyster-associated outbreaks.	Jpn J Infect Dis	62(1)	63-66	2009
Sakano C, Morita Y, Shiono M, Yokota Y, Mokudai T, Sato-Motoi Y, Noda A, Nobusawa T, Sakaniwa H, Nagai A, Kabeya H, Maruyama S, Yamamoto S, Sato H, Kimura H	Prevalence of Hepatitis E virus (HEV) infection in wild boar and Pigs in Gunma Prefecture, Japan.	J Vet Med Sci	71(1)	21-25	2009

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Iritani N, Seto T, Hattori H, Natori K, Takeda N, Kubo H, Yamano T, Ayata M, Iritani N, Kaida A, Kubo H, Abe N, Murakami T, Venemba H, Koopmans M, Takeda N, Ogura H, Seto Y	Epidemic of genotype GII.2 noroviruses during spring 2004 in Osaka City, Japan.	J Clin Microbiol	46	2406-2409	2008
Iritani N, Vennema H, Siebenga JJ, RJ Siezen, B Renckens, Y Seto, A Kaida, and M Koopmans.	Genetic analysis of the capsid gene of genotype GII.2 Noroviruses.	J Virol	82	7336-7345	2008
Nguyen TA, Hoang L, Pham LD, Hoang KT, Okitsu S, Mizuguchi M, Ushijima H	Norovirus and sapovirus infections among children with acute gastroenteritis in Ho Chi Minh City during 2005-2006.	J Trop Pediatr	54(2)	102-113	2008
Malasao R, Maneekarn N, Khamrin P, Pantip C, Tonusin S, Ushijima H, Peerakome S	Genetic diversity of norovirus, sapovirus, and astrovirus isolated from children hospitalized with acute gastroenteritis in Chiang Mai, Thailand.	J Med Virol	80(10)	1749-1755	2008
Noda M, Fukuda S, Nishio O	Statistical analysis of attack rate in norovirus foodborne outbreaks	International Journal of food microbiology	122	216-220	2008
Takanashi S, Okame M, Shiota T, Takagi M, Yagyu F, Phan TG, Nishimura S, Katsumata N, Igarashi T, Okitsu S, Ushijima H	Development of a rapid immunochromatographic test for noroviruses genogroup I and II	J Virol Method	148 (1-2)	1-8	2008
Hansman GS, Oka T, Okamoto R, Nishida T, Toda S, Noda M, Sano D, Ueki Y, Imai T, Omura T, Nishio O, Kimura H, Takeda N	Human sapovirus in clams, Japan	Emerg Infect Dis	13(4)	620-622	2007
Khamrin P, Nguyen TA, Phan TG, Satou K, Masuoka Y, Okitsu S, Maneekarn N, Nishio O, Ushijima H	Evaluation of immunochromatography and commercial enzyme-linked immunosorbent assay for rapid detection of norovirus antigen in stool samples	J Virol Methods	147	360-363	2007

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Phan TG, Khamrin P, Trinh DQ, Dey SK, Takanashi S, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H	Emergence of intragenotype recombinant sapovirus in Japan	Infection, Genetics and Evolution	7(4)	542-546	2007
Okame M, Shiota T, Hansman G, Takagi M, Yagyu F, Takanashi S, Phan TG, Shimizu Y, Kohno H, Okitsu S, Ushijima H	Anti-norovirus polyclonal antibody and its potential for development of an antigen-ELISA	J Med Virol	79(8)	1180-1186	2007
Phan TG, Kaneshi K, Ueda Y, Nakaya S, Nishimura S, Yamamoto A, Sugita K, Takanashi S, Okitsu S, Ushijima H	Genetic heterogeneity, evolution and recombination in norovirus	J Med Virol	79(8)	1388-1400	2007
Phan TG, Khamrin P, Akiyama M, Yagyu F, Okitsu S, Maneekarn N, Nishio O, Ushijima H	Detection and genetic characterization of Norovirus in oyster from China and Japan	Clin Lab	53(7,8)	405-412	2007
Nguyen TA, Khamrin P, Takanashi S, Hoang PL, Pham LD, Hoang KT, Satou K, Masuoka Y, Okitsu S, Ushijima H	Evaluation of immunochromatography test for detection of rotavirus and norovirus among Vietnamese children with acute gastroenteritis and the emergence of a novel norovirus GI.4 variant	J Tropical Pediatrics	53(4)	264-269	2007
Dey SK, Nguyen TA, Phan TG, Nishio O, Salim AFM, Rahman M, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H	Molecular and epidemiological trend of norovirus associated gastroenteritis in Dhaka City, Bangladesh	J Clin Virol	40	218-223	2007
Khamrin P, Maneekarn N, Peerakome S, Tonusin S, Malasao R, Mizuguchi M, Okitsu S, Ushijima H	Genetic diversity of noroviruses and sapoviruses in children hospitalized with acute gastroenteritis in Chiang Mai, Thailand	J Med Virol	79	1921-1926	2007
Iritani N, Seto T, Hattori H, Natori K, Takeda N, Kubo H, Yamano T, Ayata M, Ogura H, Y Seto Y	Humoral immune responses against norovirus infections of children	J Med Virol	79	1187-1193	2007

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Shiota T, Okame M, Takanashi S, Khamrin P, Takagi M, Satou K, Masuoka Y, Yagy F, Shimizu Y, Kohno H, Mizuguchi M, Okitsu S, Ushijima H	Characterization of broad reactive monoclonal antibody against Norovirus genogroup I and II: Recognition of a novel conformational epitope	J Virol	81(22)	12298-12306	2007
Nishida T, Nishio O, Kato M, Chuma T, Kato H, Iwata H, Kimura H	Genotyping and quantitation of noroviruses in oysters from two distinct sea areas in Japan	Microbiol Immunol	51(2)	177-184	2007
Saitoh M, Kimura H, Kozawa K, Nishio O, Shoji A	Detection and phylogenetic analysis of norovirus in <i>Corbicula fluminea</i> in a freshwater river in Japan	Microbiol Immunol	51(9)	815-822	2007
Okada M, Tanaka T, Oseto M, Takeda N, Shinozaki K	Genetic analysis of noroviruses associated with fatalities in healthcare facilities.	Arch Virol	151	1635-1641	2006
Phan TG, Kuroiwa T, Kaneshi K, Ueda Y, Nakaya S, Nishimura S, Yamamoto A, Sugita K, Nishimura T, Yagy F, Okitsu S, Müller WEG, Maneekarn N, Ushijima H	Changing Distribution of Norovirus Genotypes and Genetic Characterization of Recombinant GIIB among Infants and Children with Diarrhea in Japan.	J Med Virol	78(7)	971-978	2006
Okame M, Akihara S, Hansman G, hainan Y, Thien Tuan Tran H, Phan TG, Yagy F, Okitsu S, Ushijima H	Existence of multiple genotypes associated with acute gastroenteritis during 6-year survey of norovirus infection in Japan.	J Med Virol	78(10)	1318-1324	2006
Phan TG, Yagy F, Kozlov V, Kozlov A, Okitsu S, Müller WEG, Ushijima H	Viral gastroenteritis and Genetic Characterization of Recombinant Norovirus among Infants and Children with Diarrhea in Eastern Russia.	Clin Lab	52(5-6)	247-253	2006
Phan TG, Takanashi S, Kaneshi K, Ueda Y, Nakaya S, Nishimura S, Sugita K, Nishimura T, Yamamoto A, Yagy F, Okitsu S, Ushijima H	Detection and genetic characterization of norovirus strains circulating among infants and children with acute gastroenteritis in Japan during 2004-2005.	Clin Lab	52 (9-10)	519-525	2006

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Phan TG, Yan H, Li Y, Okitsu S, Müller WEG, Ushijima H	Novel Recombinant Norovirus in China.	Emerg Infect Dis	12(5)	857-858	2006
Okitsu-Negishi S, Okame M, Shimizu Y, Phan TG, Tomaru T, Kamijo S, Sato T, Yagyu F, Mueller WEG, Ushijima H	Detection of norovirus antigens from recombinant virus-like particles and stool samples by a commercial norovirus enzyme-linked immunosorbent assay.	J Clin Microbiol	44	3784-3786	2006
西尾治	ノロウイルスによる食中毒の原因食材	アニムス	14	36-40	2009
西尾治, 秋山美穂	輸入食品のウイルス汚染の実態とその対策	食品衛生研究	58(10)	23-31	2008
西尾治, 中川(岡本)玲子	ノロウイルス感染症と海産物の安全性	臨床とウイルス	36	305-314	2008
片山丘, 宮原香代子, 古屋由美子	神奈川県で検出されたノロウイルスの解析	神奈川県研報告	38	8-11	2008
宮原香代子, 片山丘, 原田美樹, 古屋由美子	神奈川県におけるウイルス性胃腸炎の集団発生状況(平成19年度)	神奈川県研報告	38	69-71	2008
片山丘, 原田美樹, 宮原香代子, 古屋由美子	感染性胃腸炎患者からの原因ウイルスの検出状況(平成19年度)	神奈川県研報告	38	72-74	2008
西尾治	ノロウイルス感染症	公衆衛生	71(12)	972-976	2007
西尾治	ノロウイルス	感染・炎症・免疫	37(4)	64-66	2007
隈下祐一, 加藤由美, 高本一夫, 古田太郎, 西尾治, 木村博一	ノロウイルス代替のネコカリシウイルスおよび各種微生物に有効なエタノール製剤の開発	防菌防黴誌	35(11)	725-732	2007
宮原香代子, 片山丘, 古屋由美子	神奈川県におけるウイルス性集団胃腸炎の発生状況について(平成18年度)	神奈川県衛生研究所報告	37	72-74	2007
森田幸雄, 藤田雅弘, 斎藤美香, 塚越博之, 星野利得, 加藤政彦, 小澤邦寿, 西尾治, 木村博一	LightCycler [®] を用いたノロウイルス遺伝子検出法の検討	食品微生物学会誌	24(4)	183-188	2007
近藤玲子, 市川高子, 大塚有加, 大瀬戸光明, 井上博雄	調理従事者からノロウイルスが検出された食中毒事例—愛媛県	病原微生物検出情報	28	285-286	2007
入谷展弘, 久保田英幸, 改田厚, 阿部仁一郎, 後藤薫, 石井啓次	2006年度に大阪市で認められたノロウイルス流行	大阪市立環科研報告	69	7-12	2007

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
西尾治	ノロウイルスの食中毒対策	臨床と微生物	33	233-237	2006
野田衛, 西尾治, 山本美和子, 伊藤文明, 池田義文, 松本勝, 荻野武雄	混合カキ検体からのノロウイルス濃縮操作におけるアミラーゼ処理の有用性	広島市衛生研究所年報	25	35-43	2006
宮原香代子, 片山丘, 古屋由美子	神奈川県におけるウイルス性集団胃腸炎の発生状況について(平成17年度)	神奈川県研報告	36	48-50	2006
柳生文宏, 砂田亜津子, 小島禎, 池戸正成, 沖津祥子, 牛島廣治	新しい遺伝子増幅技術によるノロウイルスの検出法補の比較	感染症学雑誌	80	275-276	2006
大塚有加, 市川高子, 豊嶋千俊, 近藤玲子, 大瀬戸光明, 井上博雄	2006/2007シーズンにおける散発性及び集団発生の感染性胃腸炎患者からのウイルス検出状況	愛媛県立衛生環境研究所年報	9	16-20	2006

IV

研究成果の刊行物・別刷

Short Communication

Detection of Multiple Sapovirus Genotypes and Genogroups in Oyster-Associated Outbreaks

Reiko Nakagawa-Okamoto^{1*}, Tomoko Arita-Nishida^{1**}, Shoichi Toda, Hiroto Kato¹,
Hiroyuki Iwata¹, Miho Akiyama², Osamu Nishio², Hirokazu Kimura²,
Mamoru Noda³, Naokazu Takeda⁴, and Tomoichiro Oka⁴

¹Yamaguchi Prefectural Institute of Public Health and Environment, Yamaguchi 753-0821; ²Department of Veterinary Hygiene, Yamaguchi University, Yamaguchi 753-8515; ³Infectious Disease Surveillance Center and ⁴Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo 208-0011; and ⁵National Institute of Health Sciences, Tokyo 158-8501, Japan

(Received August 4, 2008. Accepted November 17, 2008)

SUMMARY: This report describes multiple viruses in stool specimens from oyster-associated gastroenteritis. Eleven outbreaks of oyster-associated gastroenteritis were examined for enteric viruses between January 2002 and March 2006 in Japan. Multiple norovirus genotypes were detected in all outbreaks; moreover, kobuvirus, sapovirus, and astrovirus were also detected in 6, 3, and 1 of the 11 outbreaks, respectively. Notably, multiple sapovirus genogroups were detected in the stool specimens from subjects in two oyster-associated gastroenteritis outbreaks.

Viral agents of gastroenteritis affect millions of people of all ages worldwide. The major viral agents of gastroenteritis include norovirus, sapovirus, rotavirus, astrovirus, and adenovirus (1,2). Kobuvirus, which is now classified into the family *Picornaviridae*, was also recently identified as a possible pathogen for gastroenteritis (3,4). Noroviruses are the dominant cause of gastroenteritis outbreaks worldwide, and are transmitted through the ingestion of contaminated foods, through the air, and by person-to-person contact (5-7). The majority of human noroviruses can be divided into two genogroups (GI and GII) (8). Recent reports revealed sapovirus to be an important cause of gastroenteritis outbreaks (9-13), although foodborne transmission of sapovirus has not been clearly demonstrated. Sapovirus can be divided into five genogroups (GI to GV), among which GI, GII, GIV, and GV are known to be human pathogens (14,15).

The purposes of this study were to detect norovirus, sapovirus, kobuvirus, and astrovirus in stool specimens collected from subjects in oyster-associated outbreaks of gastroenteritis, and then to address the genetic diversity of norovirus and sapovirus.

Stool specimens were collected from 56 patients and 15 food handlers in 11 oyster-associated outbreaks of gastroenteritis (i.e., outbreaks in which oysters were suspected to be the cause, since all affected individuals consumed or handled oysters) between January 2002 and March 2006 in Japan. This included seven restaurants, three private homes, and a monastery (Table 1). Nucleic acids were extracted from 140 µl of a 10% (w/v) stool suspension with a QIAamp Viral RNA kit (QIAGEN K. K., Tokyo, Japan) according to the manufacturer's protocol, and reverse transcription and

reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) were performed as previously described (16). Briefly, for norovirus GI PCR, G1SKF and G1SKR primers were used; and for norovirus GII PCR, G2SKF and G2SKR primers were used (16). For sapovirus, F13, F14, R13, and R14 primers were used to amplify the 1st PCR product, whereas for the nested PCR, F22 and R2 primers were used (17). For kobuvirus, C94b and 264K primers were used, and these were designed to amplify the 3C/D junction (3). For astrovirus, PreCAP1 and 12Gr primers were used to amplify the 1st PCR product, and then Mon244 and 82b primers were used for the nested PCR (18,19). Kobuvirus- and astrovirus-positive specimens were directly sequenced, whereas norovirus and sapovirus specimens were cloned into the pCR2.1 vector (Invitrogen Japan K. K., Tokyo, Japan), and at least four clones from each specimen were sequenced. Nucleotide sequences were determined as described earlier (20). The norovirus and sapovirus sequences determined in this study were registered as EF630535-EF630617 in DDBJ.

Forty-nine of 56 (88%) stool specimens from the patients and 6 of 15 (40%) stool specimens from food handlers were positive for at least one type of virus. Interestingly, about one-third of the specimens (21 of 71 [30%]) were positive for two or more types of viruses (Table 1). Noroviruses were detected in all 11 outbreaks, including 52 of 71 (73%) stool specimens. Norovirus GI sequences were detected in 3 of 11 outbreaks, whereas we detected both norovirus GI and GII sequences in the remaining eight outbreaks. The norovirus GI sequences were separated into 10 genotypes (GI/1-5, GI/8, GI/10, and GI/13-15), while the norovirus GII sequences were separated into six genotypes (GII/3-6, GII/8, and GII/12) (Fig. 1A). Two or more genotypes of noroviruses were detected in 20 of 52 (38%) norovirus-positive specimens (Table 1).

Sapoviruses were detected in 3 of 11 outbreaks, including 5 of 71 (7%) specimens. The sapovirus sequences belonged to GI/1, GII/1, GII/2, and GII/3 (Fig. 1B). Interestingly, we detected two sapovirus genogroups in one stool specimen: SAV-H2a (GII/2) and SAV-H2b (GI/1). Kobuviruses were

*Corresponding author: Mailing address: Yamaguchi Prefectural Institute of Public Health and Environment, 2-5-67 Aoi, Yamaguchi 753-0821, Japan. Tel: +81-83-922-7630, Fax: +81-83-922-7632, E-mail: okamoto.reiko@pref.yamaguchi.lg.jp

** Present address: National Institute of Infectious Diseases, Tokyo 208-0011, Japan.

[†]These authors contributed equally to this study.

Table 1. Details of the outbreaks showing the setting, no. of persons with symptoms and the viruses detected

Outbreak code	M/D/Y	Setting	No. persons with symptoms	No. specimens collected	Case	Symptoms	Norovirus (genogroup/ genotype)	Sapovirus (genogroup/ genotype)	Kobuvirus	Astrovirus
1	01.23.02	Home	5	3	individual	+	H1 (GI/4)	SAV-H1 (GI/2)	-	-
	individual				+	H2 (GI/4)	-		-	
	individual				+	H3 (GI/2)	-		-	
2	01.23.02	Restaurant	16	14	individual	+	I1 (GI/12)	-	-	-
	individual				+	-	-	+	-	
	individual				+	I3a (GI/13), I3b (GI/4)	-	-	-	
	individual				+	I4 (GI/13)	-	-	-	
	individual				+	-	-	-	-	
	individual				+	-	-	-	-	
	individual				+	I7 (GI/12)	-	-	+	-
	individual				+	-	-	-	-	
	individual				+	-	-	-	-	
	individual				+	-	-	-	-	
	individual				+	-	-	-	-	
	food-handler				-	I10a (GI/4), I10b (GI/13)	-	-	-	-
	food-handler				-	-	-	-	-	-
	food-handler				-	-	-	-	-	-
	individual				+	I13 (GI/12)	-	-	-	-
individual	+	I14 (GI/12)	-	-	-	-				
3	01.30.02	Restaurant	39	2	individual	+	J1 (GI/2), J1 (GI/12)	-	-	-
	individual				+	J2 (GI/5)	-	-	-	
4	02.26.02	Home	8	4	individual	+	K1 (GI/5)	-	-	-
	individual				+	K2 (GI/5)	-	-	-	
	individual				+	K3 (GI/3)	-	-	-	
	individual				+	K4 (GI/4)	-	-	-	
5	12.25.02	Home	5	4	individual	+	L1a (GI/15), L1b (GI/8), L1a (GI/4), L1b (GI/8)	-	+	-
	individual				+	L2a (GI/10), L2b (GI/13), L2c (GI/4)	-	-	-	
	individual				+	L3 (GI/14), L3 (GI/3)	SAV-L3 (GI/1)	-	-	
	individual				+	L4 (GI/14), L4 (GI/5)	-	+	-	
6	02.07.03	Restaurant	3	4	individual	+	N1 (GI/8)	-	+	-
	individual				+	N2 (GI/4)	SAV-N4 (GI/3)	-	-	
	individual				+	N3 (GI/4)	SAV-N5 (GI/1)	-	-	
	food-handler				-	-	-	+	-	
7	02.16.03	Restaurant	5	3	individual	+	O1 (GI/8), O1 (GI/6)	-	+	-
	food-handler				-	O2a (GI/1), O2b (GI/4)	-	+	-	
	individual				+	O3a (GI/8), O3b (GI/6)	-	-	-	
8	03.01.03	Restaurant	12	14	individual	+	P1a (GI/4), P1b (GI/8)	-	+	-
	individual				+	P2 (GI/8), P2 (GI/3)	-	+	-	
	individual				+	P3 (GI/4)	-	+	-	
	individual				+	P4a (GI/2), P4b (GI/8)	-	+	-	
	individual				+	P5 (GI/5)	-	+	+	
	food-handler				-	-	-	-	-	
	food-handler				-	-	-	-	-	
	food-handler				-	-	-	-	+	-
	food-handler				-	-	-	-	-	-
	food-handler				-	-	-	-	+	-
	food-handler				-	-	-	-	-	-
individual	+	P14 (GI/2)	-	+	-	-				
9	12.16.04	Monastery	9	4	individual	+	R1 (GI/3)	-	+	-
	individual				+	R2 (GI/3)	-	+	-	
	individual				+	R3 (GI/1)	-	+	-	
	individual				+	-	-	-	-	
10	02.14.06	Restaurant	19	15	food-handler	-	S1 (GI/8)	-	-	-
	individual				+	S2 (GI/8), S2 (GI/4)	-	-	-	
	individual				+	S3 (GI/3)	-	-	-	
	individual				+	S4 (GI/8), S4 (GI/3)	-	-	-	
	individual				+	S5 (GI/3)	-	-	-	
	individual				+	S6 (GI/8)	-	-	-	
	individual				+	S7 (GI/8)	-	-	-	
	individual				+	S8 (GI/8), S8 (GI/6)	-	-	-	
	individual				+	S9 (GI/5)	-	-	-	
	individual				+	S10 (GI/8), S10 (GI/3)	-	-	-	
	individual				+	S11 (GI/4)	-	-	-	
	individual				+	S12a (GI/14), S12b (GI/5), S12a (GI/3), S12b (GI/5)	-	-	-	
	individual				+	-	-	-	-	
	individual				+	S14 (GI/8)	-	-	-	
	individual				+	-	-	-	-	
11	03.07.06	Restaurant	11	4	food-handler	-	-	-	-	-
	individual				+	T2a (GI/8), T2b (GI/3)	-	-	-	
	individual				+	T3 (GI/8)	-	-	-	
	individual				+	T4 (GI/8), T4 (GI/3)	-	-	-	
Total				71		52	5	19	1	

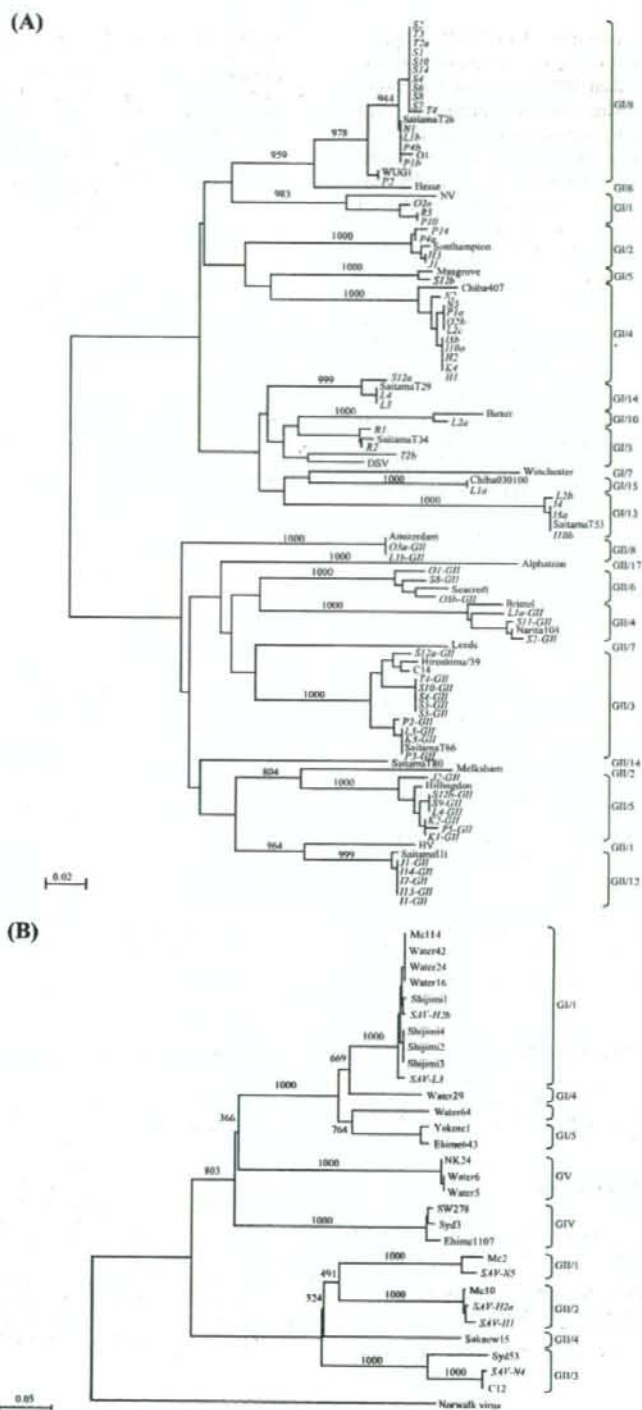


Fig. 1. Phylogenetic tree of the noroviruses (A) and sapoviruses (B) detected in this study. The trees were constructed with the partial N-terminal capsid region. The numbers on the branches indicate the bootstrap values for the clusters. Sequences and accession numbers from references (8) and (26), and Chiba030100 (AJ844469), Hiroshima/39 (AB262170), and C14 (AY845056) were used as the reference sequences.

detected in 6 of 11 outbreaks, including 19 of 71 (27%) specimens (Table 1). The kobuvirus sequences belonged to genotype A and shared greater than 98% nucleotide identity. Interestingly, 16 of 19 kobuvirus-positive specimens were also norovirus-positive, which suggests that co-contamination of these viruses in the natural environment was common. However, astrovirus was detected in only 1 of 11 outbreaks, and its nucleotide sequence was closely related to that of human serotype 4 sequences (data not shown).

In 7 of the 11 outbreaks (Outbreaks 1, 2, 5, 6, 7, 8, and 9), two or more types of viruses were detected, whereas only noroviruses were detected in the remaining four outbreaks (Outbreaks 3, 4, 10, and 11). Moreover, multiple norovirus genogroups and/or genotypes were detected in all outbreaks. It is noteworthy that we detected two sapovirus genogroups (GI/1 and GI/2) and two norovirus genotypes (GI/2 and GI/4) in one outbreak (Table 1, Outbreak 1). Although multiple norovirus genotypes were previously found, as were kobuviruses in oyster-associated outbreaks (3,4,8,21,22), this is the first report to detect multiple genotypes and genogroups of human sapoviruses in stool specimens from subjects with oyster-associated gastroenteritis. In addition, we detected two sapovirus genogroups in the same outbreak for the first time. Recently, we detected sapoviruses in the clam *Corbicula japonica* (bivalve mollusk), which is used for human consumption, and the sequences were closely related to those from patients with gastroenteritis (20). The results described in this study suggest that multiple sapovirus genotypes were concentrated in oysters, as were norovirus genotypes (23-25), which may be transmitted to humans, causing gastroenteritis. Unfortunately, no oyster samples were available for screening. The detection of sapovirus in oysters is an issue to be addressed in the future. It would also be interesting to determine whether or not the clinical symptoms of patients infected with multiple species of viruses were different from those infected with a single species of a virus.

In conclusion, sapovirus and kobuvirus were frequently detected with multiple genotypes of norovirus in stool specimens from subjects in oyster-associated outbreaks, suggesting that examination of not only norovirus but also these enteric viruses is needed in order to confirm the causative agents.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by a grant for Research on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases, a grant for Research on Food Safety from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan, and a grant from the Japan Health Science Foundation.

REFERENCES

- Bon, F., Fascia, P., Dauvergne, M., et al. (1999): Prevalence of group A rotavirus, human calicivirus, astrovirus, and adenovirus type 40 and 41 infections among children with acute gastroenteritis in Dijon, France. *J. Clin. Microbiol.*, 37, 3055-3058.
- Sdiri-Loulizi, K., Gharbi-Khelifi, H., de Rougemont, A., et al. (2008): Acute infantile gastroenteritis associated with human enteric viruses in Tunisia. *J. Clin. Microbiol.*, 46, 1349-1355.
- Yamashita, T., Sugiyama, M., Tsuzuki, H., et al. (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.
- Amber-Balay, K., Lorrot, M., Bon, F., et al. (2008): Prevalence and genetic diversity of Aichi virus strains in stool samples from community and hospitalized patients. *J. Clin. Microbiol.*, 46, 1252-1258.
- Gotz, H., de J.B., Lindbeck, J., et al. (2002): Epidemiological investigation of a food-borne gastroenteritis outbreak caused by Norwalk-like virus in 30 day-care centres. *Scand. J. Infect. Dis.*, 34, 115-121.
- Marks, P.J., Vipond, I.B., Regan, F.M., et al. (2003): A school outbreak of Norwalk-like virus: evidence for airborne transmission. *Epidemiol. Infect.*, 131, 727-736.
- Centers for Disease, Control and Prevention (2008): Norovirus outbreak in an elementary school—District of Columbia, February 2007. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, 56, 1340-1343.
- Kageyama, T., Shinohara, M., Uchida, K., et al. (2004): Coexistence of multiple genotypes, including newly identified genotypes, in outbreaks of gastroenteritis due to *Norovirus* in Japan. *J. Clin. Microbiol.*, 42, 2988-2995.
- Noel, J.S., Liu, B.L., Humphrey, C.D., et al. (1997): Parkville virus: a novel genetic variant of human calicivirus in the Sapporo virus clade, associated with an outbreak of gastroenteritis in adults. *J. Med. Virol.*, 52, 173-178.
- Johansson, P.J., Bergentoft, K., Larsson, P.A., et al. (2005): A nosocomial sapovirus-associated outbreak of gastroenteritis in adults. *Scand. J. Infect. Dis.*, 37, 200-204.
- Hansman, G.S., Saito, H., Shibata, C., et al. (2007): Outbreak of gastroenteritis due to sapovirus. *J. Clin. Microbiol.*, 45, 1347-1349.
- Hansman, G.S., Ishida, S., Yoshizumi, S., et al. (2007): Recombinant sapovirus gastroenteritis. *Japan. Emerg. Infect. Dis.*, 13, 786-788.
- Wu, F.T., Oka, T., Takeda, N., et al. (2008): Acute gastroenteritis caused by GI/2 sapovirus. *Taiwan, 2007. Emerg. Infect. Dis.*, 14, 1169-1171.
- Farkas, T., Zhong, W.M., Jing, Y., et al. (2004): Genetic diversity among sapoviruses. *Arch. Virol.*, 149, 1309-1323.
- Hansman, G.S., Oka, T., Katayama, K., et al. (2007): Human sapoviruses: genetic diversity, recombination, and classification. *Rev. Med. Virol.*, 17, 133-141.
- Kojima, S., Kageyama, T., Fukushi, S., et al. (2002): Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *J. Virol. Methods*, 100, 107-114.
- Okada, M., Yamashita, Y., Osoto, M., et al. (2006): The detection of human sapoviruses with universal and genogroup-specific primers. *Arch. Virol.*, 151, 2503-2509.
- Matsui, M., Ushijima, H., Hachiya, M., et al. (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.
- Yan, H., Yagyu, F., Okitsu, S., et al. (2003): Detection of norovirus (GI, GII), Sapovirus and astrovirus in fecal samples using reverse transcription single-round multiplex PCR. *J. Virol. Methods*, 114, 37-44.
- Hansman, G.S., Oka, T., Okamoto, R., et al. (2007): Human sapovirus in clams. *Japan. Emerg. Infect. Dis.*, 13, 620-622.
- Gallimore, C.I., Cheesbrough, J.S., Lamden, K., et al. (2005): Multiple norovirus genotypes characterised from an oyster-associated outbreak of gastroenteritis. *Int. J. Food Microbiol.*, 103, 323-330.
- Le Guyader, F.S., Bon, F., DeMedici, D., et al. (2006): Detection of multiple noroviruses associated with an international gastroenteritis outbreak linked to oyster consumption. *J. Clin. Microbiol.*, 44, 3878-3882.
- Costantini, V., Loisy, F., Joens, L., et al. (2006): Human and animal enteric caliciviruses in oysters from different coastal regions of the United States. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, 1800-1809.
- Nishida, T., Kimura, H., Saitoh, M., et al. (2003): Detection, quantitation, and phylogenetic analysis of noroviruses in Japanese oysters. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 5782-5786.
- Nishida, T., Nishio, O., Kato, M., et al. (2007): Genotyping and quantitation of noroviruses in oysters from two distinct sea areas in Japan. *Microbiol. Immunol.*, 51, 177-184.
- Hansman, G.S., Sano, D., Ueki, Y., et al. (2007): Sapovirus in water. *Japan. Emerg. Infect. Dis.*, 13, 133-135.