

プライマーは、AdV ; AdnU-S'2/AdnU-A2 (Miura-Ochiai et al, J Clin Microbiol, 45 : 2007)、BoV ; 188F/542R (Allander et al, Proc Natl Acad Sci, 102 : 2005) を用いた。

(3) RV-A、RV-Cの検出

RNA を鋳型とし、SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase を用いて One Step RT-PCR を行った。プライマーは、RV-A ; Beg9/End9 (Gouvea et al, J Clin Microbiol, 28 : 1990)、RV-C ; G8S/G8NA2 (葛谷ら, 感染症学雑誌, 77 : 2003) を使用した。

増幅産物については、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定し、目的のウイルス遺伝子であることを確認した。SaV については、マルチプレックス PCR で増幅バンドが確認された検体についてのみ、①1st ; SV-F13, F14/SV-R13, R14, nested ; F22/R2 (Okada et al, Arch Virol, 151 : 2006)、②1st ; F11/R1, nested ; F21/R2 (Okada et al, Arch Virol, 147 : 2002)、③ 1st ; SaV124F, 1F, 5F/SV-R13, R14, nested ; 1245Rfwd/R2 (Kitajima et al, Appl Environ Microbiol, 76 : 2010) の3組のプライマーを用いた nested PCR を実施し、いずれかで SaV 遺伝子が増幅された検体を SaV 陽性と判定した。

4. 二枚貝からのウイルス遺伝子の検出

中腸腺1個分を1検体とした。RNA抽出材料の作製方法としては、①10%乳剤に10ml 当たり 25mg の α -アミラーゼ (和光純薬) を添加し、37°C 1時間の処理の後、ポリエチレングリコール (PEG) 沈殿法により濃縮を行う方法か、② α -アミラー

ゼ処理した 50%乳剤の遠心上清を直接 RNA 抽出に使用する方法のいずれかを用いた。RNA 抽出から cDNA 合成までは糞便検体と同じ方法を用い、Nested PCR により各ウイルスの遺伝子の増幅を試みた。使用プライマーは以下の通りである。NoV は厚生労働省通知法のとおり。SaV は 1st ; SaV124F, 1F, 5F/SV-R13, R14, nested ; 1245Rfwd/R2。AstV は 1st ; PreCAP1/AC230, nested ; AC1' /AC230。AiV は 1st ; C(+)/C(-), nested ; C94b/264k (Yamashita et al, 前掲)。RV-A は 1st ; Beg9/End9, nested ; Beg9/7innerR (5'-GGRTTACATAACCAAYTCATT-3'), 7innerR2 (5'-GGATTGCACAGCCATTCRTT-3')。RV-C は 1st ; G8S/G8A, nested : G8S/G8NA2 (葛谷ら, 前掲)。AdV は 1st ; AdnTU7/AdnU4' (Shimada et al, J Clin Microbiol, 42 : 2004)、nested ; AdnU-S'2/AdnU-A2。PeV は 1st ; ev22+/HPV-N1 (Ito et al, J Gen Virol, 85 : 2004)、nested ; ev22+/ev22-。HEV は ① 1st ; HE7-1, 2/HE7-3, 4, nested ; HE7-5, 6, 7/HE7-8, 9 (Takahashi et al, Intervirology, 46 : 2003)、② 1st ; HE044/HE040, nested ; HE110-2 /HE041 (Mizuo et al, J Clin Microbiol, 40 : 2002)。HAV は、厚生労働省通知の方法 (食安監発 1201 第2号、平成 21 年 12 月 1 日) に従い 1st に HAV+2799/HAV-3273、nested に HAV+2907/HAV-3162 を使用した。

増幅産物については、ダイレクトシーケンス法または TOPO TA Cloning Kit for Sequencing (invitrogen) を用いた

クローニング法 (10 クローンずつ選択) により塩基配列を決定し、目的のウイルス遺伝子であることを確認した。

5. 遺伝子型の同定

NoV, SaV, AstV, AiV, RV, Adv については、系統樹解析により遺伝子型別を行った。NoV, AiV, RV, Adv は検出用 PCR の増幅産物、SaV は前述①、②、③のいずれかの増幅産物の塩基配列を解析に使用した。AstV は、糞便は AC4/AC6 及び S4/AC6 による One Step PCR、二枚貝は① 1st ; AC4/AC6、nested ; AC4/End、② 1st ; S4/AC6、nested ; S4/End による One Step nested PCR を実施し、この領域の塩基配列を型別に使用した (S4, END ; Sakamoto et al, J Med Virol, 61 : 2000、AC4, AC6, AC1' ; Sakon et al, J Med Virol, 61 : 2000)。

(倫理面への配慮)

本研究では特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。また北海道立衛生研究所ヒトを対象とする医学研究に関する規定に基づいて審査を受け、非該当と判定された。

C. 研究結果

1. 二枚貝喫食事例

二枚貝の喫食のみられた 50 事例の患者糞便 366 検体について胃腸炎ウイルスの検索を行ったところ、49 事例の患者糞便 274 検体から胃腸炎ウイルスが検出された。検出されたウイルスの組み合わせを図 1 に示した。事例別にみると、ウイルスが検出された 49 事例のうち、NoV のみ検出された事例が 28 事例 (57%) と最も多

かった。複数のウイルスが検出された事例が 20 事例 (41%) あり、その組み合わせは、NoV と他のウイルス 1 種類が 7 事例、NoV+2 種類が 10 事例、NoV+3 種類が 2 事例、NoV+4 種類が 1 事例であった。複数ウイルスの検出事例では、いずれも NoV が検出されており、1 事例を除いて NoV の陽性率が最も高かった。1 事例のみ 17 検体中 NoV 陽性 14、AiV 陽性 15 で AiV の陽性率の方が高かったが、NoV の陽性率も 80% 以上の高いレベルにあった。NoV が検出されなかった事例として SaV のみの検出が 1 事例あったが、この事例では SaV が 19 検体中 2 検体から検出されたのみで他のウイルスは検出されず、病因物質は特定されなかった。検出ウイルスの組み合わせを検体別にみると、ウイルス検出例 274 検体のうち、NoV のみ検出された検体が最も多く 200 検体 (73%) であり、NoV+1 種類が 43 検体、NoV+2 種類が 18 検体、NoV+3 種類および NoV+4 検体が 1 検体ずつと、検出ウイルスに NoV が含まれていた検体が全体の 96% を占めた。NoV が検出されなかった 11 検体の内訳は、SaV のみが 5 検体、AiV のみが 4 検体、AstV のみが 1 検体、SaV と AiV の検出が 1 検体であった。各ウイルスの検出延べ数を図 2 に示したが、NoV 以外のウイルスの検出数は、多い順に AiV、SaV、AstV、EntV であった。

NoV が検出された 48 事例のうち、検出遺伝子型が単一であったのは 18 事例のみであり、30 事例においては複数の遺伝子型の関与がみられた (図 3)。1 事例あたりの検出遺伝子型の数は、最大で 11 種類であった。また、検出された NoV 遺伝子

型の種類が多い事例ほど、NoV 以外のウイルスが検出される割合も高くなる傾向をみせた。

二枚貝喫食事例のうち 6 事例については、患者糞便と原因疑い二枚貝についてウイルス検索を行った。その結果を表 1 に示した。喫食二枚貝は、カキが 4 事例、アサリとホタテが 1 事例ずつであった。事例 No. 1 では、患者とカキから NoV を含む数種類のウイルスが検出され、NoV については複数の遺伝子型が確認された。患者とカキから検出された NoV 遺伝子型のうち、一致したのは GI. 4 と GII. 2 だけであった。また、nested PCR のプライマー間の塩基配列を比較したところ、塩基配列が 100%一致したのは患者とカキから検出された GI. 4 株のうちの一部のみであり、同じ遺伝子型であってもほとんどの株は互いに 1~数塩基異なっていた。患者とカキの両方から SaV と AiV が検出されたが、AiV 株の塩基配列は 1~数塩基異なっており、SaV については遺伝子型も一致しなかった。この他、カキからは AstV と RV-A も検出された。事例 No. 2 では患者とカキから NoV のみが検出され、遺伝子型は GII. 13 の 1 種類で、塩基配列はすべての株で 100%一致した。事例 No. 3 も患者とカキから NoV のみが検出され、遺伝子型はともに GI. 4 と GII. 13 であった。GI. 4 株は 1 塩基異なっていたが、GII. 13 株の塩基配列はすべての株で 100%一致した。事例 No. 4 では、二枚貝からは NoV と AiV、AstV が検出されたが、患者糞便からは NoV のみが検出された。患者から検出された NoV の遺伝子型は 3 種類であったが、そのうちカキからも検

出された遺伝子型は GII. 6 のみであった。患者とカキから検出された GII. 6 株のうち、一部の株の塩基配列は 100%一致した。事例 No. 5 はアサリの喫食事例で、アサリと患者糞便の両方から NoV を含む数種類のウイルスが検出された。患者から検出された NoV 遺伝子型 4 種類はすべてアサリからも検出された。そのうち GI. 4、GI. 8、GII. 15 については塩基配列が 100%一致する株も確認され、GII. 12 は 1 塩基違いであった。アサリからは NoV 以外に SaV と RV-A が検出され、患者糞便ではアサリからの検出がみられなかった AstV が 1 検体から検出された。事例 No. 6 はホタテを中腸腺ごと生で喫食した事例であった。ホタテからは NoV と AiV、AstV が検出されたが、患者糞便からは NoV のみの検出であった。患者から検出された GII. 13 はホタテからも検出され、塩基配列も一致したが、GI. 14 の検出は患者糞便のみで、ホタテからは検出されなかった。

2. 非二枚貝関連事例の食中毒事例

非二枚貝関連の食中毒疑い事例：80 事例の糞便 541 検体についてウイルス検索を行ったところ、76 事例、486 検体からウイルスが検出された。検出されたウイルスの組み合わせを図 4 に示した。76 事例のうち 60 事例(79%)からは NoV のみが検出された。主に NoV が検出され一部検体から他のウイルスが検出された事例が 13 事例(18%)あり、内訳は、NoV+AdV が 4 事例、NoV+SaV、NoV+AiV がそれぞれ 3 事例、NoV+PeV、NoV+SaV+RV-C、NoV+SaV+AdV が 1 事例ずつであった。NoV が検出されなかった事例は 3 事例あり、1

事例は検査を行った 5 検体すべてから SaV(GI.2)が、1 事例は検査を行った 6 検体すべてから RV-A(G1)が検出された。残る 1 事例は 2 検体中 1 検体から AdV が検出されたのみであり、病因物質は特定されなかった。検体別にみると、486 検体のうち、NoV のみの検出が 458 検体 (94%)と大多数を占めた。NoV と他のウイルス 1 種類が検出されたものが 12 検体 (SaV:3, AiV:3, AdV:5, PeV:1) あった。NoV 以外のウイルスの単独検出例が 16 検体あり、前述の SaV 事例の 5 検体、RV-A 事例の 6 検体、AdV 単独検出例 1 検体の他、主に NoV が検出された事例において SaV 単独検出が 3 検体、RV-C 単独検出が 1 検体確認された。

3. 感染症疑い事例

表 2 に、感染症疑い事例の患者糞便から検出された胃腸炎ウイルスを発生施設別に示した。保育所・幼稚園の事例では NoV 以外のウイルスについても検出頻度が高く、検索ウイルスのうち AiV と RV-C を除くすべてのウイルスが検出された。一方、中学生以上の年齢層の事例では、保育所・幼稚園の事例に比べて、NoV 以外のウイルスの検出検体数も検出されるウイルスの種類も少なかった。中学生以上の年齢層の事例において単独検出例が多かったウイルスは、SaV と RV-A であった。

集団胃腸炎事例の原因ウイルスを「検査検体の半数以上から検出されたウイルス」と設定した場合、今回調査対象とした非二枚貝関連の食中毒疑い事例および感染症疑い事例のうち、原因ウイルスが

特定された事例は 221 事例であった。そのうち 199 事例 (90%) は NoV であり、残り 22 事例 (10%) では NoV 以外の胃腸炎ウイルスの関与が認められた。その 22 事例の内訳を表 3 に示した。RV-A 単独によるものが 9 事例、SaV 単独が 6 事例、SaV と RV-A が 1 事例あり、NoV と他のウイルスの組み合わせが 6 事例あった。2 種類のウイルスの関与がみられた 7 事例における検体別のウイルスの組み合わせは、表 3 の上から順に ①NoV (3), RV-A (3)、② NoV (2), SaV (2)、③ NoV+SaV (4), NoV (1)、④ NoV+AdV (3), NoV (1), AdV (1)、⑤ NoV+PeV (3), NoV (1), PeV (1)、⑥ NoV (2), NoV+PeV (2)、⑦ SaV+RV-A (3), SaV (2) であった。多くが保育所の事例であったが、中学生以上の年齢層の事例においても、RV-A 単独感染が 3 事例、SaV 単独感染が 4 事例確認された。

D. 考察

二枚貝喫食事例では、NoV が単独で検出された事例が 57%、検体が 73%であった。NoV と他のウイルスの組み合わせで複数のウイルスが検出された事例が 41%、検体が 23%であった。つまり、ウイルス陽性事例の 98%、検体の 96%から NoV が検出されたことになる。二枚貝喫食事例では NoV 以外のウイルスの関与が多く的事例で認められるものの、大多数は NoV との混合感染であったことから、食中毒の原因究明にあたっては、まずは NoV 検査を優先する対応で問題ないと考えられた。ただ、検体数は少ないが、SaV, AiV, AstV が単独で検出された検体がそれぞれ 5, 4, 1 検体確認されている。NoV の検出率が低

かった場合は、他のウイルスの感染例が含まれている可能性があるため、SaV, AiV, AstV や RV-A の検索が推奨される。

二枚貝喫食事例では、NoV を除くと AiV が最も多く検出された。AiV は、一部の患者において単独検出も確認され、おそらく胃腸炎の発症に関わっていると思われる。しかし、単独感染による集団胃腸炎の報告がないことから、食中毒の原因としてどの程度関与しているかは不明である。単独感染例の胃腸炎患者の情報も病因ウイルスか否かの判断材料になることから、今後も情報を集積していくことが望まれる。また、二枚貝喫食による複数ウイルスの混合感染が感染者の症状の重症度にどのような影響を与えるかは不明であるが、ウイルスの混合感染の実態を把握しておくことは疫学的に有用である。特に、GI と GII を含む複数の NoV 遺伝子型の関与がみられた二枚貝喫食事例では複数のウイルスが検出される可能性が高いと推測される。このような事例を中心に NoV 以外のウイルスについても検索を行い、情報を蓄積していく必要がある。

患者糞便と二枚貝を用いた実態調査では、検出された NoV の遺伝子型が単一の場合は患者と二枚貝から検出されたウイルス株の塩基配列が一致した。しかし、複数の NoV 遺伝子型や NoV 以外のウイルスの関与する事例については二枚貝と喫食患者から検出されたウイルスの一致率が低い傾向にあった。今回の調査により、二枚貝には複数の NoV 遺伝子型も含めて多様なウイルスが蓄積していることが明らかとなった。患者と二枚貝から検出されたウイルスの型が一致しない場合は原

因食品かどうかの判断が難しい。その場合の行政判断の参考になるべく、貝と喫食患者をセットにしたウイルス検索データを集積し、保健所等に還元することが必要であると考えられた。

非二枚貝関連の食中毒疑い事例では、NoV が単独または主に検出された事例が全体の 96% を占めていたが、NoV 以外のウイルスとして、SaV と RV-A の単独感染事例が 1 事例ずつ認められた。SaV と RV-A は、中学生以上の年齢層の感染症疑い事例においても単独検出例が NoV に次いで多く、成人に感染が拡がりやすいウイルスであると考えられた。以上の結果から、二枚貝の関与しない食中毒疑い事例においても、まず NoV 検査を行い、検出されない場合は第 2 選択肢として SaV, RV-A の検査を実施するのが適当と考えられた。

検索の対象とするウイルスについては、食品検査 (nested PCR) にも対応出来るよう、早急に検査体制を整えておく必要がある。

E. 結論

食中毒が疑われる事例の原因究明にあたっては、まずは NoV 検査を実施し、検出率が低かった場合は、二枚貝喫食事例では AiV, SaV, AstV, RV-A などを、非二枚貝関連事例では SaV と RV-A を検索の第 2 の選択肢とするのが適当と考えられた。これらのウイルスについては食品検査にも対応出来るよう、早急に検査体制を整えておく必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

吉澄志磨，後藤明子，石田勢津子，野田衛：二枚貝関連の食中毒事例における各種胃腸炎ウイルスの関与－北海道．病原微生物検出情報，32：361-363，2011.

2. 学会発表

吉澄志磨，後藤明子，石田勢津子，田中智之，野田衛：二枚貝の喫食のみられ

た食中毒疑い事例における各種胃腸炎ウイルスの関与について，第32回日本食品微生物学会，2011年10月，東京

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

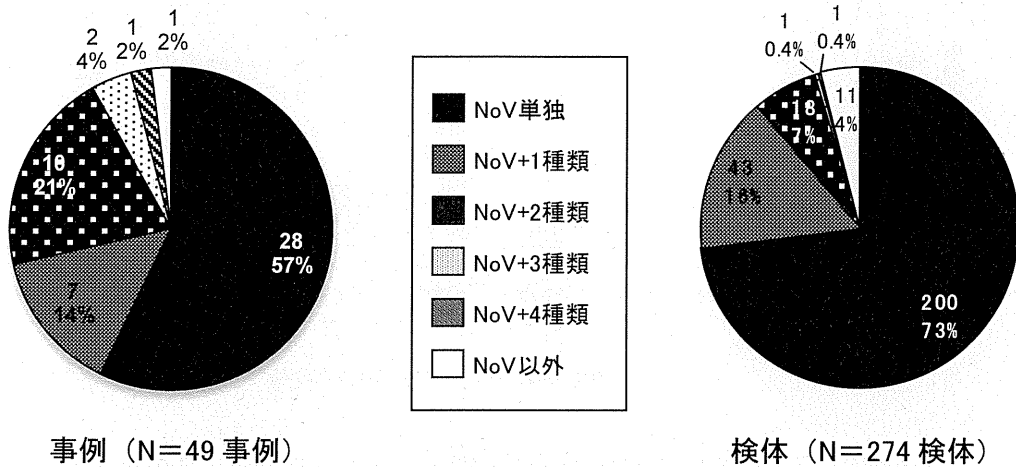


図1 二枚貝喫食事例における検出ウイルスの組み合わせ

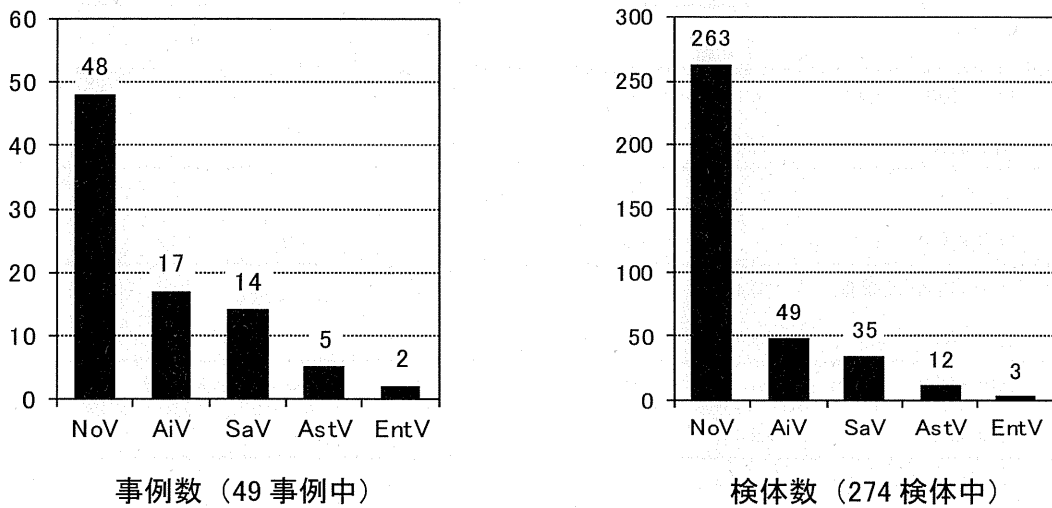


図2 二枚貝喫食事例における各ウイルスの検出数(延べ数)

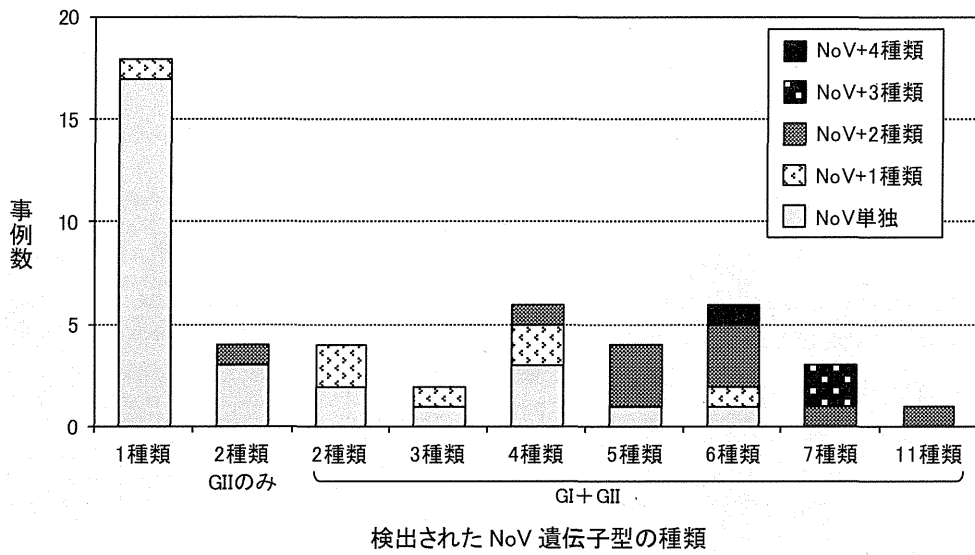
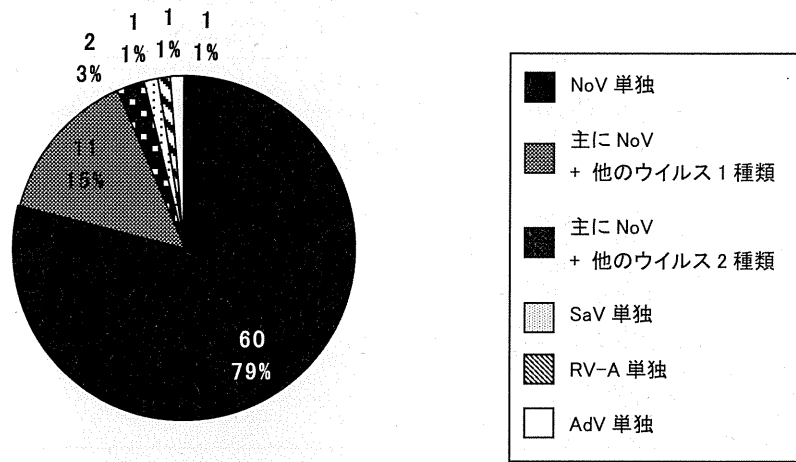


図3 1事例あたりのNoV遺伝子型および胃腸炎ウイルスの検出数

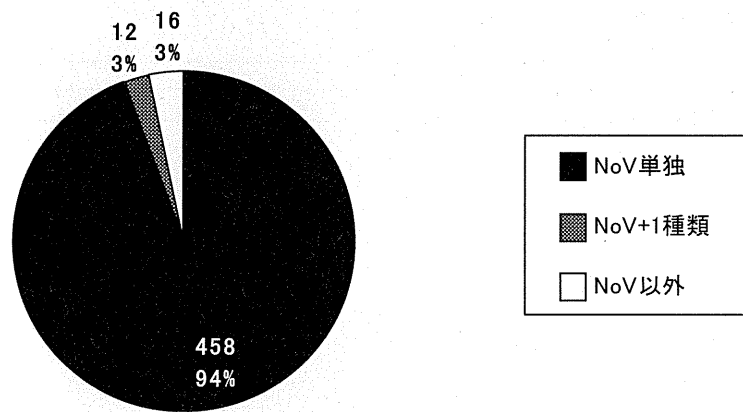
表1 二枚貝と喫食患者から検出された胃腸炎ウイルスの種類及び遺伝子型

事例No.	検体	検出ウイルスの遺伝子型					
		NoV		SaV	AiV	AstV	RV-A
		GI	GII				
1	カキ(加熱して喫食)	GI.1, 4, 7, 11	GII.2, 3, 4, 6, 13	GI.1	typeA	type8	G1
	患者糞便	GI.4, 8	GII.2, 12, 14	GI.3	typeA	-	-
2	カキ(生食)	-	GII.13	-	-	-	-
	患者糞便	-	GII.13	-	-	-	-
3	カキ(加熱して喫食)	GI.4	GII.13	-	-	-	-
	患者糞便	GI.4	GII.13	-	-	-	-
4	カキ(加熱して喫食)	-	GII.6, 9, 11, 14	-	typeA	型不明	-
	患者糞便	GI.12	GII.2, 6	-	-	-	-
5	アサリ(加熱して喫食)	GI.3, 4, 5, 8	GII.2, 12, 15	GV	-	-	G1
	患者糞便	GI.4, 8	GII.12, 15	-	-	type3	-
6	ホタテ(生食)	-	GII.2, 6, 13	-	typeB	型不明	-
	患者糞便	GI.14	GII.13	-	-	-	-

※ 事例No.1,2,4,6 は喫食品と同一ロット、事例No.3, 5 は同一海域産の別ロット品について検査を実施した



事例 (N=80 事例)



検体 (N=486 検体)

図4 非二枚貝関連の食中毒疑い事例における検出ウイルスの組み合わせ

表2 感染症事例の糞便検体から検出された胃腸炎ウイルスの組み合わせ

検出ウイルス		検出検体数									
		保育所 幼稚園	小学校	児童養護 施設	中学校	高校	高等専門 学校	大学	障害者 施設	病院	高齢者 施設
単独	NoV	153	104	10	25	32	-	5	133	12	90
	RV-A	18	7	-	1	-	2	-	-	-	5
	SaV	14	-	-	6	-	-	-	12	-	-
	AdV	3	2	-	1	-	-	-	-	-	-
	PeV	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NoV + 1種類	NoV + AdV	15	3	1	-	-	-	-	1	1	3
	NoV + SaV	5	2	-	-	-	-	-	-	-	-
	NoV + AstV	3	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	NoV + RV-A	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	NoV + PeV	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	NoV + BoV	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NoV + AiV	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	
NoV + 2種類	NoV + AdV + PeV	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	NoV + AstV + RV-A	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	NoV + SaV + AdV	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	NoV + AstV + AdV	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NoV以外 2種類	SaV + RV-A	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	SaV + AstV	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	RV-A + PeV	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	AstV + PeV	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ウイルス検出なし		15	7	3	21	29	5	0	20	1	14
合計		252	126	14	54	62	7	5	166	14	112

表3 非二枚貝関連の集団胃腸炎の原因として NoV 以外のウイルスの関与が見られた事例

検出ウイルス	発生施設	糞便検査数	検出検体数(遺伝子型) [※]				
			NoV	RV-A	SaV	AdV	PeV
RV-A 単独	保育所	5		5 (G3)			
	保育所	4		2 (G3)			
	保育所	2		2 (G3)			
	保育所	5		5 (G1)			
	保育所	4		3 (G1)			
	小学校	6		6 (G2)			
	高等専門学校	4		2 (G2)			
	高齢者施設	5		5 (G9)			
	飲食店(食中毒疑)	6		6 (G1)			
SaV 単独	保育所	4			4 (GI.3)		
	幼稚園	6			4 (GI.1)		
	中学校	5			5 (GI.3)		
	知的障害者施設	5			5 (GIV)		
	知的障害者施設	5			5 (GIV)		
	飲食店(食中毒疑)	5			5 (GI.2)		
NoV + RV-A	保育所	6	3 (GII.2)	3 (G3)			
NoV + SaV	保育所	4	2 (GII.3)		2 (GI.3)		
	保育所	5	4 (GII.13)		4 (GV)		
NoV + AdV	保育所	5	4 (GII.3)			4 (type41)	
NoV + PeV	保育所	5	4 (GII.13)				4
	保育所	4	4 (GII.13)				2
SaV + RV-A	保育所	5		3 (G3)	5 (GII.3)		

※ 検査検体の半数以上から検出されたウイルスについてのみ記載

網掛けは、中学生以上の年齢層の事例

厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)

「食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究」

総合研究協力報告(平成 22～24 年度)

食品の関与が推定される集団胃腸炎におけるウイルス検索

研究協力者	森 功次	東京都健康安全研究センター
研究分担者	田中 智之	堺市衛生研究所
研究協力者	永野 美由紀	東京都県境安全研究センター
研究協力者	秋場 哲哉	東京都県境安全研究センター
研究協力者	林 志直	東京都県境安全研究センター

研究要旨

集団胃腸炎発生時にノロウイルス (NoV) 以外の胃腸炎起因ウイルスについて検索を行い、それらの発生状況について 2010 年～2012 年にかけて集積したデータの解析をはかった。調査期間に発生した 1,825 件の胃腸炎事例についてウイルス検索を実施したところ、ウイルス検出事例数は 1,056 事例 (57.9%) であった。内訳は NoV が検出された事例が 1,000 事例 (94.7%) と多くを占めていたが、56 事例 (5.3%) はその他のウイルスが関与したと考えられる事例であった。これら NoV 以外のウイルスが検出された事例のうち、食品の関与が推定される集団胃腸炎はサポウイルスによるものが 26 事例、A 群ロタウイルスによるものが 23 事例であった。これらの検索結果から NoV 以外の胃腸炎ウイルスが小児など低年齢層の施設内で発生する集団胃腸炎のみでなく、成人年齢層における食中毒および食中毒疑い事例にも関与していることのほか、食品の関与が推定されたサポウイルスによる集団胃腸炎事例が、調理従事者の関与や生カキの喫食など NoV と同様の感染経路により発生していることが確認できた。

A. 研究目的

ウイルス性胃腸炎集団事例の発生は 12 月～1 月に発生のピークがみられるのが例年の傾向である。集団事例において、その主な病因ウイルスはノロウイルス (Norovirus : NoV) であり、食品や調理従事者の関与が推定される食中毒事例および、幼稚園や小学校などのほか高齢者施設内で

みられる、食品を介さないと考えられる施設内流行においてもその傾向は同様である。しかし、ウイルス性胃腸炎の起因ウイルスは NoV のほか、サポウイルス (Sapovirus : SaV)、ロタウイルス (Rotavirus : RV)、アストロウイルス (Astrovirus : AstV)、アデノウイルス (Adenovirus : AdV) が知られており、食品を介さないで推定される事

例も含まれるが、東京都では過去にこれらウイルスによる集団胃腸炎事例をいずれも経験している。

そこで、食品の関与が推定される集団胃腸炎発生時に、原因物質が確定される率を向上させることを目的として NoV 以外のウイルスについて集団胃腸炎の起因ウイルスであるかを検討し、それらの発生状況について 2010～2012 年にかけてデータの集積をはかった。

B. 研究方法

1. 材料

2010 年～2012 年にかけて得られた 1,825 件の胃腸炎事例に関連した糞便を主な検査材料とした。

2. 胃腸炎ウイルスの検索

Kageyama ら(J Clin Microbiol,2003) の real-time PCR 法による NoV 検索の結果陰性の場合に SaV、RV (GARV および GCRV)、AstV、AdV について real-time PCR 法を用いて検索した。SaV 検索には Oka ら(J Med Virol,2006)、GARV 検索には Jothikumar ら(J Virol Method,2009)の検出系を用いた。GCRV、AstV、AdV 検索には Mori らのプライマーおよびプローブ(J Virol Method, in press)を用いた。

3. 塩基配列の解析

real-time PCR 陽性の場合には conventional PCR を実施し、明瞭なバンドの得られた事例についてはダイレクトシーケンスにより塩基配列解析を試みた。

(倫理面への配慮)

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

C. 研究結果

1. 胃腸炎ウイルス検出状況

ウイルス検索を実施した 1,825 事例のうち、検索対象としたウイルスが検出された事例数は 1,056 事例(57.9%)であった。内訳は NoV が検出された事例が 1,000 事例(94.7%)と最も多くの割合を占めていたが、SaV : 26 事例 (2.5%)、GARV : 23 事例(2.2%)などその他のウイルスに起因すると考えられる事例はノロウイルスとの混合感染を除くと 56 事例 (5.3%) みられた。NoV との同時検出事例を含めると、NoV 以外のウイルスが検出された事例は 81 事例(7.7%)であった (表 1)。

検索を実施した期間において、検出数に大きな差はあるが、NoV の次に多く検出されたウイルスは SaV であった。SaV の検出時期に季節的な特徴はみられなかった (図 1)。

これら NoV 以外のウイルスが検出された事例のうち、食品の関与が推定される集団胃腸炎事例において、調理従事者から NoV 以外のウイルスが検出された集団胃腸炎事例は SaV による事例および GARV による事例であった。これらの事例には他県市が関連した広域感染事例も含まれていた。また、生カキの喫食歴のある事例からは SaV と AstV が検出された。

2. 塩基配列の解析

糞便材料から検出されたウイルスの塩基配列による遺伝子型を図 2 に示した。

SaV の検出された (NoV との同時検出を含む) 54 事例のうち、2010 年末～2012 年にかけて検出された型はほぼ近縁な G I . 2 (Oshimal/2009 類似株) であった。

検出された GARV は G1~4、G8 および G9 であった。G3 および G4 は 2010 年以降検出されなかった。AstV は type1、4、7、8 が検出され、二枚貝類の喫食歴のある事例から検出されたものは type1 と type4 であった。

D. 考察

ウイルス検索を試みた三年間の胃腸炎集団事例におけるウイルス検出状況において、起因ウイルスとして NoV が常に大きな割合を占めていた。しかし、この期間に発生したウイルス性胃腸炎の 7.7%からその他のウイルスが検出され、ほぼ一定の割合で NoV 以外のウイルスが胃腸炎事例に関与しているものと推察された。これら NoV 以外のウイルスが検出された集団胃腸炎事例には、小児など低年齢層の施設内で発生する集団胃腸炎のみでなく、成人年齢層における食中毒および食中毒疑い事例も含まれていた。

検出数に大きな差はあるものの、NoV の次に集団胃腸炎事例の起因ウイルスとして推定されたものは SaV であった。これら SaV の検出事例は調理従事者の関与が推定される事例や生カキの喫食歴のある事例が含まれており、施設内の感染症的な集団事例のほか、NoV 同様の要素により SaV による胃腸炎が発生していることが確認され、実際に SaV を原因とする食中毒事例とされた事例もみられた。検出された SaV の遺伝子型は 2010 年春~年末、2010 年末~2012 年前半、2012 年末と検出される型に違いがあり、流行の主体となる遺伝子型が変化していく傾向が伺われた。

GARV においても調理従事者からウイル

スが検出された事例や SaV 同様に他県市の関連した広域感染事例がみられた。

今回の検索の結果から、集団胃腸炎事例において病原ウイルスを検索する場合、検出率に大きな差があることから、最初に NoV の検査を実施し、検出状況に応じてサポウイルス等のウイルス検索を実施することが望ましいと考えられた。また、NoV 以外のウイルスもほぼ一定の割合で集団胃腸炎事例に関与していることが確認できたことから、NoV 以外のウイルスの検査体制の整備も関連事例において自治体間の連携を図る際に必要であると思われた。

E. 結論

- ・NoV 以外のウイルスは、ほぼ一定の割合で集団胃腸炎事例に関与しているものと推察された。

- ・NoV 以外の胃腸炎ウイルスが、小児など低年齢層の施設内で発生する集団胃腸炎のみでなく、成人年齢層における食中毒および食中毒疑い事例にも関与していることが確認できた。

- ・SaV が、調理従事者の関与が推定される事例や生カキの喫食歴のある事例から検出されたことから、NoV 同様の感染経路で SaV による胃腸炎が発生していることが確認できた。

- ・集団胃腸炎事例において検出されるウイルスの多くの割合は NoV であることから、最初に NoV の検査を実施し、検出状況によりサポウイルス等の胃腸炎起因ウイルスの検索を行う必要があると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- Mori K., Akiba T., Nagano M., Emura S., Akamatsu N., Iwakoshi K., Hayashi Y., Kai A., Noda M. : Prevalence of Sapovirus-related community gastroenteritis in Tokyo from April 2008 to March 2011. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, 2011, 札幌市
- 森功次、永野美由紀、秋場哲哉、林志直、

甲斐明美、野田衛：DNA シーケンサを用いた SSCP によるノロウイルス集団胃腸炎事例の解析。第 33 回日本食品微生物学会学術総会、2012、福岡市

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

表1：東京都における胃腸炎ウイルス検出状況（2010年1月～2012年12月）

	2010年		2011年		2012年		計	
検査事例数	697		565		563		1825	
ウイルス 検出事例数	432	(100%)	268	(100%)	356	(100%)	1056	(100%)
NoVG I	36	(8.3%)	23	(8.6%)	28	(7.9%)	87	(8.2%)
NoVG II	328	(75.9%)	200	(74.6%)	285	(80.1%)	813	(77.0%)
NoVG I +G II	42	(9.7%)	18	(6.7%)	15	(4.2%)	75	(7.1%)
SaV	9	(2.1%)	7	(2.6%)	10	(2.8%)	26	(2.5%)
GARV	10	(2.3%)	4	(1.5%)	9	(2.5%)	23	(2.2%)
同時検出・その他*	7	(1.6%)	16	(6.0%)	9	(2.5%)	32	(3.3%)

* : NoV+SaV : 20, NoV+SaV+Ast : 4, NoV+Ast : 1,
SaV+GARV : 1, SaV+Ast : 3, GCRV : 1, Ast : 1, Ast+Ad : 1

事例数

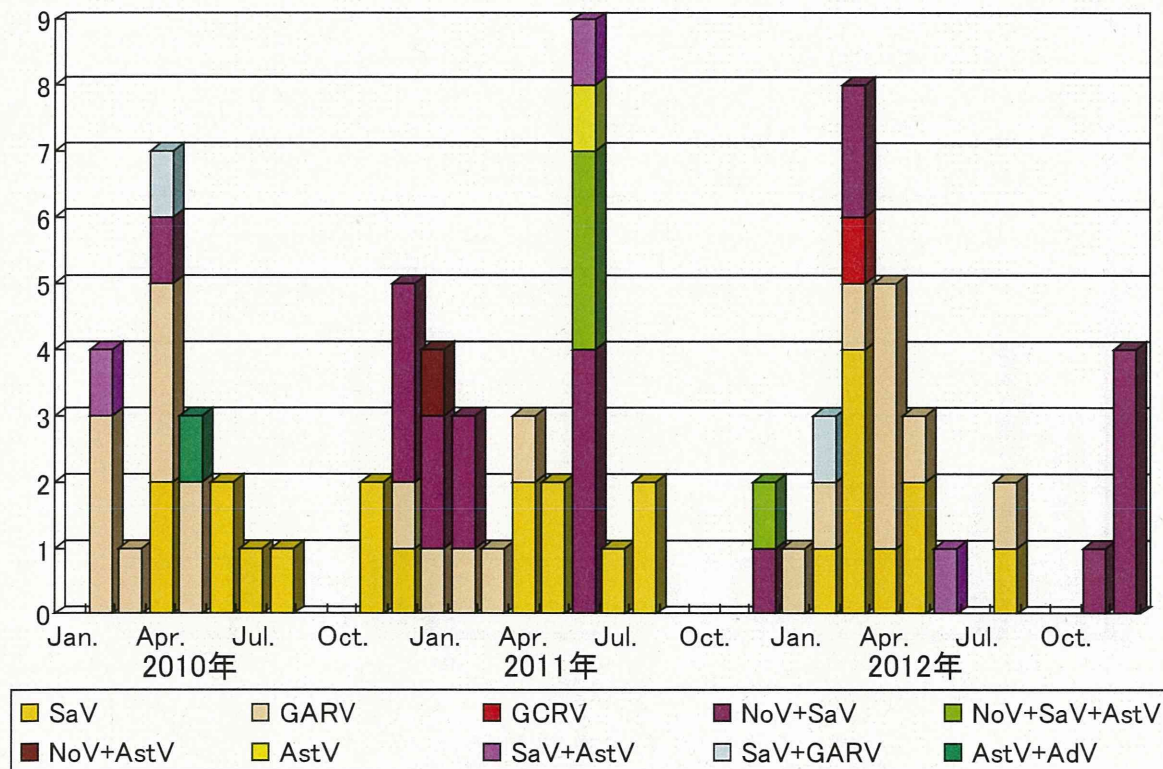
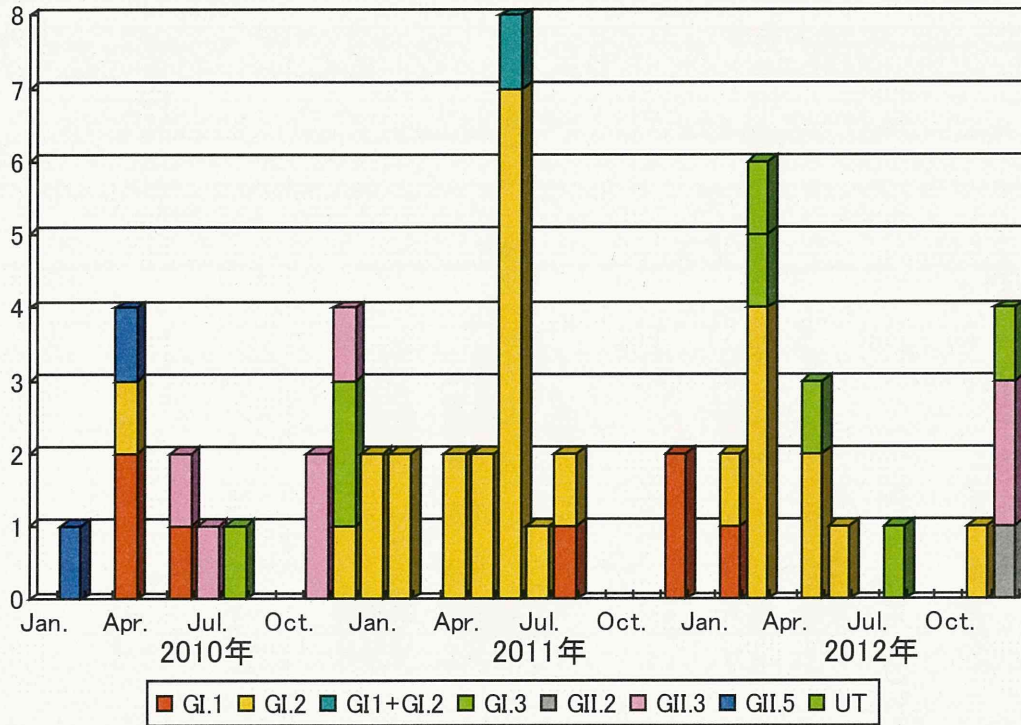


図1：集団胃腸炎事例におけるNoV以外のウイルス検出状況
（東京都：2010年～2012年、NoV同時検出事例を含む）

事例数 サポウイルス



事例数 A群ロタウイルス

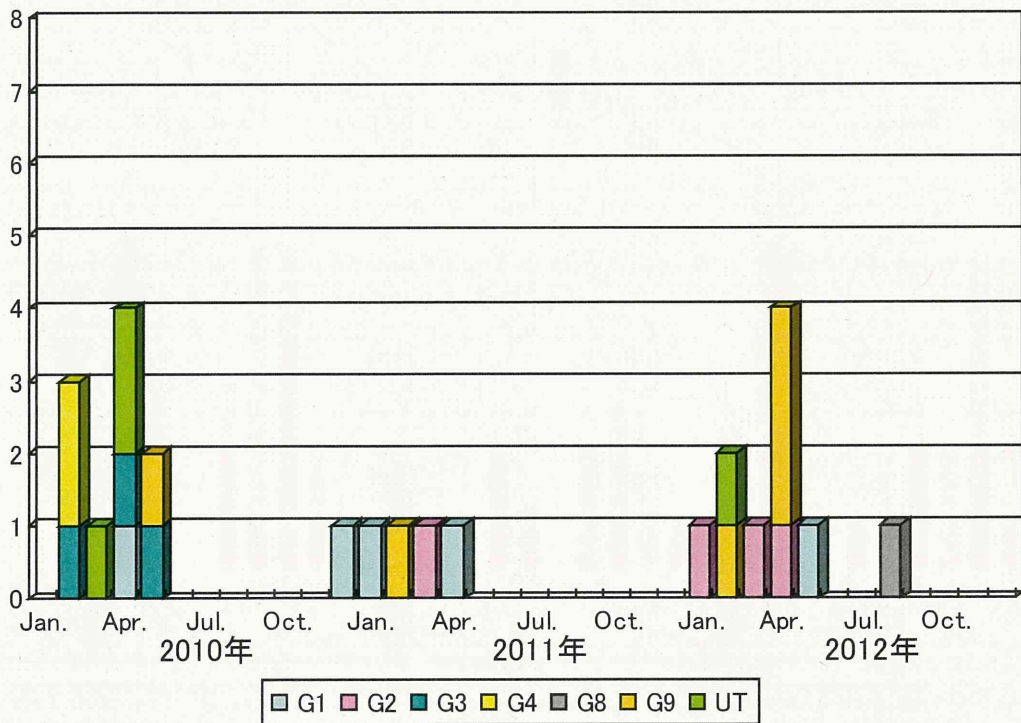


図2：検出されたウイルスの遺伝子型（東京都：2010年～2012年）

厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)

「食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究」

総合研究協力報告(平成 22～24 年度)

カキ関連食中毒疑事例からのウイルスの検出および 国産生食用カキのノロウイルス・A 型肝炎ウイルス汚染調査

研究協力者	入谷 展弘	大阪市立環境科学研究所
研究分担者	田中 智之	堺市衛生研究所
研究協力者	改田 厚	大阪市立環境科学研究所
	阿部 仁一郎	大阪市立環境科学研究所
	関口 純一朗	大阪市立環境科学研究所
	山元 誠司	大阪市立環境科学研究所
	久保 英幸	大阪市立環境科学研究所

研究要旨

2001 年 1 月～2012 年 3 月の期間に当研究所に搬入されたカキの喫食を伴う食中毒疑事例について腸管系ウイルスおよび A 型肝炎ウイルスの検索を行った。その結果、ノロウイルス以外に 5 種類のウイルス（アイチウイルス、アストロウイルス、サポウイルス、A 群ロタウイルス、エンテロウイルス）が 26 事例（29.5%）40 検体（14.0%）から検出され、カキの喫食にはノロウイルス以外に少なくとも 5 種類のウイルス感染リスクがあることが示された。ノロウイルス陰性や検出率が低い事例については、他のウイルス検査を追加で実施することが必要であると考えられた。

2010 年～2012 年に販売されていた国産生食用カキについてノロウイルスの検索を行ったところ、46.2%がノロウイルス陽性であった。大阪市では毎年カキ関連食中事例の発生が認められており、今後もノロウイルス食中毒の感染源として注意が必要である。

A. 研究目的

冬季に多発する食中毒は主にノロウイルスが原因である。他の腸管系ウイルスも食中毒の原因になりうるが、その関連については不明な点が多い。今回、ノロウイルス以外のウイルスと食中毒との関連性を明らかにすることを目的としてカ

キの喫食を伴う食中毒疑事例を対象にウイルスの検出を行った。

また、生食用カキにおけるウイルスの汚染状況把握とカキからのウイルス検査方法の確立を目的に国産市販生食用カキのノロウイルスおよび A 型肝炎ウイルス検査を実施した。

B. 研究方法

1. 材料

2001年1月～2012年3月の期間に当研究所に搬入されたカキの喫食を伴う食中毒疑 88 事例の患者糞便 286 検体（すべてノロウイルス検査済）を対象として、10種類のウイルス（サポウイルス、アストロウイルス、アイチウイルス、腸管アデノウイルス、ロタウイルス A 群・C 群、A 型肝炎ウイルス、エンテロウイルス、パレコウイルス、ボカウイルス）の検査を実施した。C 群ロタウイルス、エンテロウイルス、パレコウイルス、ボカウイルスについては、2001年1月～2004年11月までの 45 事例 164 検体を対象とした。患者の年齢層は、18 歳以上が 278 名（97.2%）、15 歳 1 名、不明 7 名であった。

国産生食用カキは、2010年12月（9ロット）、2011年12月（8ロット）、2012年12月（9ロット）に市販されていた合計 26 ロットを、1 ロットにつきカキ 3 個をまとめて、ノロウイルスおよび A 型肝炎ウイルスの検査に用いた。26 ロットの産地は、岡山県産 9 ロット、兵庫県産 8 ロット、広島県産 7 ロット、三重県産 1 ロット、宮城県産 1 ロットであった。

2. カキ関連食中毒患者糞便材料からのウイルス検出

サポウイルスは Oka らのリアルタイム RT-PCR 法 (JMV 78, 1347-53, 2006)、アストロウイルスは Sakon らの RT-PCR 法 (JMV 61, 125-131, 2000)、アイチウイルスは Yamashita らの RT-PCR 法 (JCM 38,

2955-61, 2000)、C 群ロタウイルスは Kuzuya らの RT-PCR 法 (JCM 34, 3185-9, 1996)、A 群ロタウイルスおよび腸管アデノウイルスは市販の ELISA キット（ロタクロンおよびアデノクロン E、TFB）、エンテロウイルスは Tapparel らのリアルタイム RT-PCR 法 (JCM 47, 1742-9, 2009) を一部改変した方法、パレコウイルスは Ito らの RT-PCR 法 (JGV 85, 391-8, 2004)、ボカウイルスは Kantola らのリアルタイム RT-PCR 法 (JCM 48, 4044-50, 2010)、A 型肝炎ウイルスは西尾らのリアルタイム RT-PCR 法 (IASR 23, 274-5, 2002) を用いて検査を実施した (表 1)。

3. カキからのノロウイルス検出

カキは、むき身カキから中腸腺を摘出し、凍結融解により粉碎した後、PBS (-) で 30-40% 乳剤を作製し、野田ら (広島市衛生研究所年報 25, 35-43, 2006) のアミラーゼ処理・PEG 法を用いて前処理を実施した。即ち、上記カキ乳剤に 25mg の α -アミラーゼを加えて、37°C で 60 分間攪拌し、グリコーゲンの消化を行った。アミラーゼ処理後、10,000rpm 20 分間遠心した上清に PEG 溶液（最終濃度 12% PEG#6000 および 1M NaCl）を加え、4°C で 2-3 時間放置した。さらに 4°C 10,000rpm 20 分間遠心した沈渣に 0.4ml の DEPC 処理水を加え、RNA 抽出用試料とした。

ウイルス RNA の抽出には High Pure Viral RNA kit (Roche)、抽出した RNA の DNase 処理には Turbo DNA-free kit (Life Technologies)、cDNA の作製には High-Capacity cDNA RT kit (Life Technologies) または SuperScript III (Life Technologies)、ノロウイルス検査

には Kageyama らのリアルタイム RT-PCR(JCM 41, 1548-57, 2003)を用いた。さらにノロウイルスが検出された検体については、Capsid N/S 領域の遺伝子を増幅し、遺伝子型別した。A 型肝炎ウイルスは糞便の場合と同様の方法で実施した。

(倫理面への配慮)

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

C. 研究結果

1. カキ関連食中毒疑事例からのウイルス検出状況

今回対象としたカキ関連食中毒疑事例において、ノロウイルスは 85 事例 (96.6%) 197 検体 (68.9%) から検出された。ノロウイルス以外には、合計 26 事例 (29.5%) 40 検体 (14.0%) から 5 種類のウイルスが検出され、25 事例は 2~4 種類のウイルス、27 検体は 2~3 種類のウイルスが検出された (表 2)。ノロウイルス以外で最も多かったのは、20 事例 (22.7%) 29 検体 (10.1%) から検出されたアイチウイルスであった。他にはアストロウイルス (5 事例、8 検体)、サポウイルス (7 事例、7 検体)、A 群ロタウイルス (1 事例、1 検体)、エンテロウイルス (1 事例、5 検体) が検出された。また、アイチウイルス 9 検体、アストロウイルス 1 検体、サポウイルス 2 検体、エンテロウイルス 1 検体はノロウイルス陰性例における単独検出であった。他のウイルスはすべて陰性であった。

ノロウイルスの検出率が低かった事例の中で、他のウイルス検査を行う

ことによって、患者のウイルス陽性率が高くなった事例が 2 事例 (事例番号 01-12 および 01-17) 認められた。事例番号 01-12 では、患者からノロウイルスが検出されたのは 3/8 (37.5%) であったが、他のウイルス検査を実施することでノロウイルスを含め 5/8 (62.5%) がウイルス陽性となった (表 3)。事例番号 01-17 においても、患者からノロウイルスが検出されたのは 5/22 (22.7%) であったが、他のウイルス検査を実施することでノロウイルスを含め 12/22 (54.5%) がウイルス陽性となった (表 4)。

2. 生食用カキのノロウイルス汚染状況

3 年間で検査したカキ 26 ロット中 12 ロット (46.2%) からノロウイルスが検出された (表 5)。

平成 22 年度は 9 ロット中 7 ロット (77.8%) からノロウイルスが検出された。産地別では、岡山県産 2 ロット、兵庫県産 2 ロット、広島県産 1 ロット、三重県産 1 ロット、宮城県産 1 ロットと検査したすべての産地においてノロウイルス陽性となった。カキ 1 個あたりのウイルス量 (RNA コピー数) は 80~1333 コピーであり、検体番号 OY10-4 を除いたすべての陽性検体においてリアルタイム RT-PCR 法の判定基準値である実測値 10 コピー以上であった。

平成 23 年度は 8 ロット中 3 ロット (37.5%) からノロウイルスが検出された。産地別では、岡山県産、広島県産、兵庫県産がそれぞれ 1 ロットずつ陽性であった。カキ 1 個あたりのウイルス量 (RNA コピー数) は 181~221 コピーであり、す