

平成 29 年度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)
「ウイルスを原因とする食品媒介性疾患の制御に関する研究」
総括研究報告

ウイルスを原因とする食品媒介性疾患の制御に関する研究

研究代表者 野田 衛 国立医薬品食品衛生研究所・食品衛生管理部 第四室長

研究要旨

ノロウイルス等のウイルスによる食品媒介性疾患の発生および被害の拡大を効果的に低減するための手法の確立を目標として以下の研究を実施した。

1. 食中毒検査体制の強化に関する研究

9 機関を対象にノロウイルス定量検査の外部精度管理を実施した結果、食品検体を用いても概ね良好な結果が得られた。パンソルビン・トラップ法において、パンソルビン試薬のホルマリン固定の程度が弱い製品ではウイルス回収率が低下することが判明したが、再固定プロトコルを付加することで、これまでどおり使用することができた。食中毒事例の調理従事者および患者から検出されたノロウイルスの塩基配列は、RT-PCR の検出プライマー内の配列の一致/不一致は、RdRp 領域から VP1 全長のより長い配列を用いた場合の一致/不一致と概ね一致した。昨年度開発した迅速簡便なふき取りからのウイルス検出法に食品添加物に指定されている Tween20 を用いることで一定のウイルス回収率が得られた。カキからのノロウイルス検出法として開発したアセトン処理法における添加するアセトンおよびアミラーゼの量の至適化を行った。下水、患者、カキ等からのウイルスの検出と遺伝子解析を実施し、食品媒介ウイルスの流行状況を把握した。2016/17 シーズンは、GII. 2, GII. 17, GII. 4(Sydney2012)などが主要流行株であった。2017/18 シーズンのノロウイルスの流行は低調で、施設の拭き取り検査からもそれが示唆された。特定の細胞/コール酸の培養系でヒトサポウイルスにおいて培養上清中のウイルス RNA シグナル増加およびコピー数の経時的増加を認めた。サポウイルスの分離の成否に接種材料の調整法が関与している可能性が示唆された。Caco-2 細胞, INT407 細胞, HT29/219 細胞の 3 種類の培養細胞についてウシ胆汁, ブタ胆汁酸, 5 種類のコール酸(CA, DCA, GCA, GCDCA, CDCA), マレイン酸, オレイン酸について、細胞毒性を示さない最大の添加量を決定した。市販カキ等について検査したところ、カキ自体に加え、浮遊液からもノロウイルスが検出され、交差汚染を起こすリスクが示された。2017 年 1 月から 2 月にかけて東京都をはじめとする複数の自治体で発生した刻み海苔による大規模食中毒事件において食品や施設の拭き取りからのウイルス検出およびその塩基配列の比較がその調査に大きく寄与した。

2 調理従事者からの二次汚染防止に関する研究

水溶性高分子ポリマー化合物をコーティングした後、手洗いする方法について、その手洗い効果をバクテリオファージで検証した結果、その有用性が示された。ネコカリシウイルスおよびマウスノロウイルスを用いて、天然生理活性物質 120 化合物について抗ノロウイルス活性の評価を行ったところ、14 化合物が抗ウイルス活性を示した。ヒトノロウイルス不活性化評価にかかる代替ウイルスの選定およびその方法について検討し、3 種類のウイルス(ネコカリシウイルス F9 株、ネコカリシウイルス ym3 株およびコクサッキーA6 型ウイルス)をその候補として決定した。CB5 ウイルスはエタノールに対し高感受性であることから、エタノール系消毒剤の評価ではノロウイルスの代替ウイルスとしては不適切であると考えられた。健康管理において、ノロウイルス感染に比較的共通してみられる胃部の異常、便性状の変化、倦怠感などを把握することがノロウイルス感染者の把握に重要であることが示唆された。ノロウイルスに感染した従事者がトイレで排便した場合、作業着の汚染を介して食品取扱室にウイルスを持ち込む可能性があることが示唆された。手袋を着用してのトイレの利用は、作業着等への汚染防止の手段として有用である。2017 年 1 月から 2 月に発生した刻み海苔関連食中毒事件において、和歌山県御坊市での事例では一人が 6,250 コピーのノロウイルスを摂取したと推定された。また、海苔の刻み作業を行った感染者の便中のウイルス量は、約 $10^9/g$ であったと推定された。

研究分担者		坂 恭平	青森県環境保健センター
高木 弘隆	国立感染症研究所		ー
斎藤 博之	秋田県健康環境センター	菩提寺 誉子	同上
		筒井 理華	同上
鈴木 達也	一般財団法人食品薬品安全センター	秋野 和華子	秋田県健康環境センター
上間 匡	国立医薬品食品衛生研究所	高橋 知子	岩手県環境保健研究センター
		植木 洋	宮城県保健環境センター
研究協力者			
岡 智一郎	国立感染症研究所	小泉 光	同上
中阪 聡亮	一般財団法人食品薬品安全センター	田村 務	新潟県保健環境科学研究所
吉澄 志磨	北海道立衛生研究所	林 真由美	同上
後藤 明子	同上	広川 智香	同上
大久保 和洋	同上	新井 礼子	同上
石田 勢津子	同上		

宗村 佳子	東京都健康安全研究センター
永野 美由紀	同上
木本 佳那	同上
小田 真悠子	同上
奥津 雄太	同上
新開 敬行	同上
清水 智美	川崎市健康安全研究所
清水 英明	同上
入谷 展弘	大阪健康安全基盤研究所
山元 誠司	同上
改田 厚	同上
阿部 仁一郎	同上
久保 英幸	同上
三好 龍也	堺市衛生研究所
中谷 誠宏	同上
岡山 文香	同上
福井 陽子	同上
内野 清子	同上
小林 和夫	同上
谷澤 由枝	広島県立総合技術研究所保健環境センター
重本 直樹	同上
山本 美和子	広島市衛生研究所
則常 浩太	同上
兼重 泰弘	同上
藤井 慶樹	同上
松室 信宏	同上
小林 孝行	福岡県保健環境研究所
吉富 秀亮	同上
中村 麻子	同上
芦塚 由紀	同上
梶原 淳睦	同上
永田 文宏	国立医薬品食品衛生研究所

永嶋 俊樹 同上
(順不同)

A. 研究目的

ウイルス性食中毒は依然多発し、近年はノロウイルス以外のウイルスによる食中毒も増加傾向にある。近年のウイルスを原因とする食中毒は食品取扱者からの食品の二次汚染を原因とする場合が多く、その汚染防止対策の確立が急務である。ウイルス性食中毒発生時に、迅速な原因究明や蔓延防止のための措置の実施を可能とするためには、発生例の原因食品や感染経路を特定することが重要である。しかし、遺伝子の変異し検出できないなどの事例も認められており、より簡便かつ網羅的な検査法の確立が求められている。また変異株の出現を早期に探知し、被害拡大前にあらかじめ検査法を構築するためには食品や環境のウイルスサーベイランスが不可欠である。食品ウイルス検査は外部精度管理体制が確立されていないため信頼性が確保されておらず、検査の信頼性確保も急務の課題である。一方、飲食店や大規模調理施設等における、食品従事者からの二次感染を効果的に予防するためには、手洗い、環境・トイレの清掃・消毒等が確実に実施されていることを検証するための簡便な方法、現場に応じたウイルスの除去方法の確立が求められている。さらに現在ノロウイルスに有効とされる各種消毒剤が市販されているが、不活化試験の検査法が定まっていないこと等から有効性を客観的に判断することができず、試験法のガイドラインが求められている。

本研究では、近年、件数・患者数ともに増加傾向にある、ノロウイルス、サポウイルス、E型肝炎ウイルス等のウイルスによる食品媒介性疾患の発生および被害の拡大を効果的に低減するための手法の確立を目標とする。

B. 研究方法

1. 食中毒検査体制の強化に関する研究

(1) 食品のウイルス検査の精度管理

国内で食品のノロウイルス検査を実施している9機関を対象として、7検体〔ウイルス懸濁液：3検体、食品：3検体(3検体はいずれも同一濃度)および陰性検体：1検体〕および標準DNA溶液を調査検体として配布し、定量検査を各検査機関にて実施した後、回収した結果の解析を行った。検査方法はあらかじめ指定した共通の方法とし、検量線作成用陽性コントロール溶液も共通とした。

(2) 食中毒調査等に係る検査法の開発・改良・評価

① パンソルビンの品質に関する課題への対応

食品検体からのウイルス検出法であるパンソルビン・トラップ法に使用するパンソルビンの2015年以降に購入したロットについてホルマリン固定の程度が弱くなっていることが判明した。このことはウイルス回収率の低下をもたらす原因になることから、その対応法を検討した。

② 現行の遺伝子解析手法の評価

食中毒か感染症かの判断に有用とされている患者、調理従事者、食品等から検出されたノロウイルスの塩基配列の比較の有用性について、実際の食中毒事例等

において検証した。一部においては、RdRp領域からVP1全長のより長い領域について塩基配列を決定し、通常の検査で実施している領域の解析の妥当性について調べた。

③ ふき取り検体からのウイルス検出法の改良

昨年度開発した迅速簡便なふき取りからのウイルス検出法に食品添加物に指定されている界面活性剤の使用を検討した。

④ カキからのウイルス検出法の改良

カキからのウイルス検出法として有用性が認められたアセトン処理について、添加するアセトンおよびアミラーゼの至適量を検討した。

(3) サポウイルスおよびノロウイルスの培養法に関する検討

ブタサポウイルスの培養系を参考に、異なる細胞およびコール酸の組み合わせで、培養系を構築し、サポウイルス陽性材料を添加し、培養を試みた。5～8日培養後、培養上清を回収し、ウイルスRNA量を測定した。また、接種材料中の感染性を持つウイルス量を推定した。

Caco-2細胞、INT407細胞、HT29/219細胞の3種類の培養細胞についてウシ胆汁、ブタ胆汁酸、5種類のコール酸(CA、DCA、GCA、GCDCA、CDCA)、マレイン酸、オレイン酸について、細胞毒性を示さない最大の添加量を調べた。

(4) 食品媒介ウイルスの食中毒事例、胃腸胃炎事例、下水、食品および拭き取りからの検出と遺伝子解析

岩手県、宮城県、堺市、福岡県において定期的に下水からの食品媒介性ウイル

スの検出を行い、患者からの検出ウイルスや感染性胃腸炎報告数と比較した。

青森県、岩手県、宮城県、秋田県、東京都、大阪市、堺市において食中毒等の集団胃腸炎からのウイルスの検出と遺伝子解析を行い、流行ウイルスの性状把握を行った。

秋田県、川崎市において、カキ等の二枚貝からノロウイルス等の検出と遺伝子型別を行い、ヒトからの検出ウイルスと比較した。

大阪市、堺市、広島県において食中毒事件における拭き取りあるいは食品取扱施設や公共施設のトイレの拭き取りを継続的に実施した。

2. 調理従事者からの二次汚染防止に関する研究

(1) ノロウイルスの不活化

抗ノロウイルス活性を持つ化合物の探索を目的に、ネコカリシウイルスおよびマウスノロウイルスを用いたスクリーニング系を導入し、120の化合物について評価を行った。

(2) ウイルスの不活化法のガイドライン作成のための基礎研究

消毒剤のウイルスに対する不活化効果判定試験法のガイドライン作成に必要な基礎データを得るために、評価試験に使用するウイルスの候補として想定した6種類のウイルス(ネコカリシウイルス1株、エンテロウイルス71型、ヒトパレコウイルス1型、コクサッキーA6型ウイルス、コクサッキーB3型ウイルス、コクサッキーB5型ウイルス)について、NaClO (原液有効塩素5%)、エタノール(EtOH 99.5%)、

過酸化水素(H₂O₂, 原液30%)、炭酸ナトリウム(Na₂CO₃, 0.5~1%)に対する感受性を調べ、ノロウイルスの代替ウイルスとしての評価を行った。

(3) 効率的な手洗いの方法の検討

ノロウイルスの代替ウイルスとして、MS2ファージを使用して、汚染前の水溶性高分子ポリマーによる手指のコーティングが、手洗い後に手に残存するウイルス汚染を減らす効果があるかどうか評価した。3人の被験者についてファージで手指を汚染し、A：手洗い無し、B：水のみの手洗い、C：ハンドソープによる手洗い、D：3%カルボキシメチルセルロースの45%エタノール液(CMC液)によるコーティング後にファージで汚染し水洗いを実施して、手に残存したファージをグローブジュース法で回収し、ファージ濃度を定量した。

(4) ノロウイルス感染における臨床症状の把握

2014年に発生したノロウイルス食中毒事件の調査時に独自の患者調査票を用い、対象者に症状に関する詳細な聞き取り調査を実施し、その結果を集計・分析した。

(5) ノロウイルスの排便後の拡散の実証実験

排便後に手指や臀部が汚染された場合、その後どのように汚染が拡大していくのか実証実験を行った。また、トイレ使用時における手袋の着用が、二次汚染防止に有効であるかを検証した。

(6) 食品等の汚染ウイルス量の推定

2017年1月に和歌山県御坊市で発生した磯和えによる集団食中毒事例において、原因食品とされる磯和えからreal time

PCRによりノロウイルス遺伝子が検出され、磯和えに含まれるノロウイルス遺伝子のコピー数は1gあたり125コピーと推定された。この値を基に摂取されたウイルス量や汚染源と推定される感染者の糞便中のウイルス量などの推定を行った。

(7) 手洗いの実施状況の検証

食品取扱業者における手洗いの実施状況等について調査を実施した。

(倫理面への配慮)

本研究において、ヒトから提供を受けた検体(便検体)は感染症法に基づく感染症発生動向調査、食品衛生法に基づく食中毒原因究明調査等の行政検査として採取されたものである。その試料の取り扱いに関しては、試料提供者、その家族の人権、尊厳、利益が保護されるよう十分に配慮した。また提供試料、個人情報厳格に管理、保存した。一部の研究においては各研究機関において研究倫理審査委員会に申請し、承認を得た。

C. 研究結果

1. 食品等からのウイルス検出法および遺伝子解析法の開発

(1) 食品のウイルス検査の精度管理

検量線作成では1機関において2回の測定でばらつきが認められたが、測定傾向は同じであった。一方、標準DNA溶液では実測値における変動係数が0.009と非常に小さいものであり、精度良くPCR操作が実施されているものと考えられた。これに対して、ウイルス懸濁液では変動係数が約0.1であった。さらに今回初めてきな粉を基材とした食品検体を採用し、濃縮工程を含め

た外部精度管理調査を行ったところ、変動係数は従来方式において0.3~0.4を示した。また、国際的に推奨されているロバスト統計量を算出したところ、変動係数はウイルス懸濁液では約0.12、模擬食品検体では0.2~0.3となった。

(鈴木研究分担報告)

(2) 食中毒調査に係る検査法の開発・改良・評価

① パンソルビンの品質に関する課題への対応

パンソルビンの出荷基準は、一定量以上のIgGを吸着できるかどうかであり、核酸漏出については規定されていない。製品としては正常であることから、メーカー側に対応を求めることは困難であり、使用者側で問題解決を図る必要がある。そこでパンソルビンからブドウ菌由来核酸の漏出が起こらないように再固定プロトコルを考案した。再固定を行うことで、問題発生前に購入したパンソルビンと同等以上の回収率が得られた。再固定法のマニュアルを作成した。

(斎藤研究分担報告)

② 現行の遺伝子解析手法の評価

北海道において、現在、通常の検査で患者や食品等からのノロウイルス遺伝子の検出に用いているPCRの増幅産物(RdRp領域:約290nt, RdRp-VP1領域:約340nt)の塩基配列が一致する検体は、より長い配列を用いて比較してもほぼ一致することが示された。しかし、一部の事例において、検出用プライマー内の配列の比較結果ではみえなかった不一致が多く検出された。

(吉澄研究協力報告)

青森県で2012年9月～2017年8月に発生した集団胃腸炎事例の内、調理従事者からノロウイルスが検出された食中毒14事例の遺伝子解析を行った。その結果、11事例の調理従事者由来株と発症者等由来株の塩基配列の相同性は100%であった。他の3事例では、塩基配列が異なるケースが認められた。

(坂研究協力報告)

③ ふき取り検体からのウイルス検出法の改良

ふき取りおよび再浮遊液に食品添加物に指定されている界面活性剤の使用を検討した結果、Tween20で一定のウイルス回収率が得られた。

(谷澤研究協力報告)

④ カキからのウイルス検出法の改良

カキからのノロウイルス添加回収試験の結果、アセトン処理法は中腸腺1gに対し250 μ lのアセトンを添加した場合に実測値コピー数が高い結果となった。アミラーゼ溶液の添加量では検出感度に違いはみられなかった。一方、PEG沈殿法でカキを濃縮した場合は、中腸腺1gに対し10 μ lのアミラーゼ溶液を添加した場合に実測値コピー数が高いことが示唆された。

(山本研究協力報告)

(3) 食品媒介ウイルスの食中毒事例、胃腸胃炎事例、下水、食品および拭き取りからの検出と遺伝子解析

青森県で2016/17シーズンに発生したノロウイルス食中毒事例から検出された遺伝子型はGII.2であった。

(坂研究協力報告)

岩手県のノロウイルスによる集団発生は、2014/15、2015/16シーズンのGII.4

とGII.17の流行や、2016/17シーズンのGII.2による大流行において他県と同様の傾向であった。食中毒事例において、無症状の調理従事者の中に約12%の不顕性感染者が認められた。2014年9月から2017年11月の下水の調査では2014/15シーズン、2015/16シーズンに多発したGII.17、2016/17シーズンに多発したGII.2は集団発生が起こる約3か月前から流入下水から検出された。

(高橋研究協力報告)

秋田県において2016年～2017年に購入した生アサリからGII.2(中腸腺1gあたり 10^2 以上 10^3 未満)、GII.4 Sydney 2012、GI.7(10^1 以上 10^2 未満)が検出された。砂抜き液は不検出であった。パック入り生カキからはGII.2、GII.3、GII.17(いずれも 10^2 以上 10^4 未満)、GI.2、GI.4が検出された。パック充填の浮遊液は1検体からGII.17(9.39/ml)が検出された。岩カキではGII.4 Sydney 2012、GII.17がそれぞれ1検体から検出された。2016/2017シーズンの食中毒事例は、カキが推定原因食品であった1事例のみでノロウイルスGII.2が検出された。集団感染事例および感染症発生動向調査において検出されたノロウイルスの遺伝子型は、GII.2が最も多く、次いでGII.4 Sydney 2012であった。

(秋野研究協力報告)

宮城県において、流入下水について、ノロウイルスおよびサポウイルスの検出を試みた結果、各ウイルス遺伝子は通年検出された。2017/18シーズンは前シーズンと比較して、サポウイルスは年間を通して昨シーズンよりも高い濃度で検出さ

れた。2010/11 シーズンから 2017/18 シーズンに県内で検出されたノロウイルスの遺伝子型は GII. 4 が期間を通じて最も多かった。一方、シーズンによっては GII. 2, GII. 3, GII. 17 による流行も確認された。

(植木研究協力報告)

2016/17 シーズンの東京都におけるノロウイルスを原因とする食中毒疑い等の集団発生事例 210 例から検出された遺伝子型は、GII. 2 が 65.7% (138/210) で最多であり、次いで GII. 17 が 11.9% (25/210), GII. 4 が 9.0% (19/210) であった。2017 年 2 月には、学校給食で提供された「刻み海苔」を原因とした大規模な食中毒が都内で 4 事例発生したが、その遺伝子型は GII. P17_GII. 17 であり事例間および刻み海苔と患者間でその配列は一致した。

(宗村研究協力報告)

川崎市において、市内の河川に生息する二枚貝および市内で流通する二枚貝についてノロウイルス検査を行った。2017 年 8 月および 10 月に採取した河川のシジミから GII. 2, GII. 4 および GII. 17 が検出された。8 月、10 月および 12 月に市内で購入した市販のシジミの汚染率は 5.6% であった。10 月および 12 月に市内で購入した市販の生食用生カキの 25.0% から遺伝子型別不能の GI が検出された。

(清水研究協力報告)

大阪市において施設フキトリまたは調理従事者からノロウイルスが検出された食中毒(疑いを含む)事例において調査したすべての事例において両者由来ノロウイルスの遺伝子型、塩基配列は一致した。

食品汚染後約 2 か月後に起こった広域食中毒事件では施設フキトリの検査結果

が汚染経路の解明につながる科学的根拠となった。2017 年の集団胃腸炎 46 事例で最も多く検出された遺伝子型は GII. 4 Sydney_2012 で。次いで GII. 2 であった。2017 年 12 月に購入した市販の生食用カキにノロウイルス汚染は認められなかった

(入谷研究協力報告)

堺市において 31 施設 179 検体の拭き取り検体についてノロウイルス遺伝子検出を試みたが、すべて陰性であった。模擬拭き取り検体を用いたノロウイルス遺伝子検出期間に関する検討では、汚染後 1 ヶ月以上検出されることが考えられた。

下水サーベイランスにおいて、ノロウイルスでは臨床検体と下水検体から得られた結果は、よく相関していた。その他のサポウイルス等については、臨床検体からの検出頻度は低かったが、下水検体からは高頻度に検出された。

(三好研究協力報告)

広島県において昨年度に引き続き、公共施設トイレについてふき取りによるノロウイルスのモニタリング調査を実施したところ、昨年度と比較してトイレのノロウイルス汚染は少なかった。

(谷澤研究分担報告)

福岡県において、終末処理場流入水からのノロウイルス検出を行った。2016/17 シーズンは、2016 年 11 月から GII の定量値が増加し始め、2017 年 1 月にピークを示した。また、感染性胃腸炎の報告数は 2016 年 12 月にピークを示し、両者の動態に関連が認められた。

(小林研究協力報告書)

(4) サポウイルスおよびノロウイルスの培養法に関する検討

供試した細胞とコール酸類の組合せにより、そのいくつかの培養上清にウイルス RNA の強いシグナルが確認された。また別法により RNA コピー数を測定したところ経時的な増加が認められ、増加率は $10^3 \sim 10^4$ 倍であった。これらはヒトサポウイルス GI, GII, および GIV で確認された。

接種材料別では接種材料を精製水調整したものではウイルス RNA の増加は認められず、分離培養用培地で調整したものではウイルス RNA の増加が認められるものがあつた。

(高木研究分担報告)

Caco-2, INT407, HT29/219 の 3 種類の培養細胞についてウシ胆汁, ブタ胆汁酸, 5 種類のコール酸(CA, DCA, GCA, GCDCA, CDCA), マレイン酸, オレイン酸について、細胞毒性を示さない最大の添加量を決定した。

(上間研究分担報告)

2. 調理従事者からの二次汚染防止に関する研究

(1) ノロウイルスの不活化に関する研究

ネコカリシウイルスおよびマウスノロウイルスを用いたスクリーニング系により、評価を行った120化合物のうち、14化合物においてネコカリシウイルスまたはマウスノロウイルスに対して抗ウイルス活性が認められた。

(小林研究協力報告)

(2) ウイルスの不活化法のガイドライン作成のための基礎研究

供試した 6 種類のウイルスについて NaClO (原液有効塩素 5%), エタノール (EtOH 99.5%), 過酸化水素(H_2O_2 , 原液 30%), 炭酸ナトリウム(Na_2CO_3 , 0.5~1%) に対する感受性を調べたところ、不活化効果は使用した株によって顕著な違いが認められた。今年度および昨年の結果を総合的に判断し、ネコカリシウイルス F9 株, ネコカリシウイルス ym-3 株およびコクサッキーA6 型ウイルスの 3 種類のウイルス株が代替ウイルスとして適当であると判断した。

(高木研究分担報告)

コクサッキーB5 型ウイルスを用いてエタノールによる不活化試験を実施し、CB5 が代替ウイルスとして適当か再評価を行った。その結果、局方エタノール、終濃度 80% (ウイルスと混合した時に 80%) のエタノールは、反応時間 60 秒で速やかに CB5 を 4log10 程度不活化し、CB5 がエタノールに対して高感受性であることが示された。

(上間研究分担報告)

(3) 効率的な手洗いの方法の検討

A: 手洗い無し, B: 水のみの手洗い, C: ハンドソープによる手洗い, D: 3%カルボキシメチルセルロースの45%エタノール液(CMC液)によるコーティング後にフェージで汚染し水洗いの4法による手洗い後のフェージ濃度(平均値)はそれぞれ A: 623pfu/ml, B: 27.6pfu/ml, C: 42.6pfu/ml, D: 2.2pfu/ml で、Dが最も濃度が低かった。

(田村研究協力報告)

(4) ノロウイルス感染における臨床症状の把握

ノロウイルス食中毒事件の調査時に独自の患者調査票を用い、対象者に症状に関する詳細な聞き取り調査を実施した結果、有症者にノロウイルス感染の特徴とされる下痢、嘔吐、発熱以外の症状が認められる例が少なくなく、軽症を含み、症状に多様性が認められた。一方、便性状の変化(下痢、軟便を含む)や胃部の違和感などは共通の症状として多くの有症者で認められた。

(野田研究分担報告)

(5) ノロウイルスの排便後の拡散の実証実験

排便後のお尻を拭く作業において手指が汚染された後、トイレトペーパーで肛門部を清拭し、衣服を整えた際に作業着に汚染が起こった。作業着(上着)を脱いでトイレを使用した場合、下着が汚染された。臀部に汚染があった場合、下着に浸透し下着表面に移行することが示された。手袋の装着は、肛門の清拭や身支度を整えることによる二次汚染の防止に有用であった。

(野田研究分担報告)

(6) 食品等の汚染ウイルス量の推定

2017年1月に和歌山県御坊市で発生した集団食中毒事例において、一人あたり磯和えを50g食べたと仮定すると、一人が6,250コピーのノロウイルスを摂取したと計算された。また、汚染が生じた磯和えが約800人分程度と仮定すると、本事例に提供された磯和え全体として 5×10^6 コピーの汚染があったと計算された。一方、汚染源と推定される海苔の刻み作業を行った感染者の便中のウイルス量は、約 10^9 /g程度であったと推定された。

(野田研究分担報告)

D. 考察

1. 食中毒検査体制の強化に関する研究

(1) 食品のウイルス検査の精度管理

国際的に推奨されているロバスト方式による解析によってもこれまでの算術的に求めた統計量と同等の統計量が得られることがわかった。また、食品検体を採用することにより、検査工程の増加に伴いウイルス懸濁液と比較すると変動係数は大きくなるものの、精度管理を評価するには問題のない程度のばらつきであると考えられた。

(鈴木研究分担報告)

(2) 食中毒調査に係る検査法の開発・改良・評価

① パンソルビンの品質に関する課題への対応

パンソルビンの再固定はパンソルビンを購入後に1回だけ行えばよく、以後は長期保存してこれまでどおり使用できることから、試験検査機関における負荷も最小限で済ませられるものと考えられた。

(斎藤研究分担報告)

② 現行の遺伝子解析手法の評価

北海道における食中毒事例内の検体の比較において、RT-PCRの検出用プライマー内の短い配列情報(RdRpおよびVP1領域の一部)を用いた結果が、その領域全体の一致・不一致の状況から大きくは逸脱しないと考えられた。しかし、一部の事例において検出用プライマー内の配列の比較結果では見えなかった不一致が多く検出された事例もあったことから、さらにデータを集積し比較検討を必要性が示

唆された。

(吉澄研究協力報告)

青森県で、同一食中毒事例内で、同じ遺伝子型でも塩基異なる検体がみられた。異なる病原体が感染した場合、感染後に遺伝学的な変異が発生した場合、PCR やシーケンス反応において塩基の読み違いを起こした場合など、様々な可能性があるため、食中毒の判断・詳細な把握のためには、今後も引き続きデータを蓄積し、解析していく必要がある。

(坂研究協力報告)

③ ふき取り検体からのウイルス検出法の改良

昨年度開発した方法で検査に使用する界面活性剤(Zwittergent)は、人体への影響が懸念され、調理環境等でふき取りを行う際には注意が必要である。今回の結果より、食品添加物に指定されている界面活性剤がZwittergentの代用品として有用である可能性が示唆された。今後はZwittergentに近い性質を持ち、食品添加物に指定されている界面活性剤で、更に検討を行う必要がある。

(谷澤研究協力報告)

④ カキからのウイルス検出法の改良

アセトン処理法において添加するアセトンおよびアミラーゼの至適添加量を決定した。しかし、カキからのウイルスの回収は若干の検出感度が良くなる程度にとどまった。今後も引き続き検査法の検討を行う必要があると思われる。

(山本研究協力報告)

(3) 食品媒介ウイルスの食中毒事例、胃腸胃炎事例、下水および食品からの検出と遺伝子解析

ノロウイルスによる食中毒の発生は、ノロウイルスの流行状況や流行する遺伝子型の変化等により影響を受ける。そのため、流行ウイルスの検出動向について継続的に監視することが、食中毒予防に寄与する。食中毒事例等の集団発生や感染症発生動向調査などから検出されたノロウイルスの遺伝子型等を調べた。2016/17シーズンはGII. 2(青森県、岩手県、秋田県、東京都、川崎市、宮城県、大阪市、堺市)、GII. 17(秋田県、東京都、川崎市、大阪市)、GII. 4(秋田県、宮城県、東京都、川崎市、大阪市)、などが主流であった。2017年2月には、学校給食で提供された「刻み海苔」を原因とした大規模な食中毒が東京都内で4事例発生したが、その遺伝子型はGII. P17_GII. 17であり事例間および刻み海苔と患者間でその配列は一致した。また当該事例において、施設フキトリ由来ノロウイルスの遺伝子解析結果が汚染経路の解明につながる重要な科学的根拠となった。

ノロウイルス等の食品媒介性ウイルスは糞便中に排出される。そのため、下水を継続的にモニタリングすることにより、顕性感染や不顕性感染を問わず、ヒトでの流行状況を迅速にモニタリングすることができる。また、下水中のウイルス汚染量をモニタリングすることにより、患者の発生動向よりも先に流行の増加を捉えることができる可能性もある。また、カキ等の二枚貝がノロウイルス等の汚染を受ける主な原因は下水であることから、

下水中のウイルスのモニタリングはカキ等の二枚貝の汚染リスクを早期に探知し、汚染防止に寄与できる可能性がある。これらの背景から、我々は長期に渡り、下水のウイルス調査を継続している。今年、岩手県、宮城県、堺市、福岡県において下水の調査を実施した。これまでの調査と同様に下水中のノロウイルス汚染量は感染性胃腸炎患者の報告数のピークと同時期にピークとなり、また報告数が多いほど定量値も大きくなり、臨床検体と下水検体で検出される遺伝子型に相関がみられた。引き続き調査を継続し、下水中のウイルス量と感染性胃腸炎の発生动向の関連性についてデータを蓄積する予定である。

堺市における調理施設のふき取り調査では、ノロウイルスは検出されなかった。聞き取り調査から、衛生管理が良く行われている施設であったことや、調査期間にはノロウイルスの大きな流行がみられていないことなどの要因により、検出されなかった可能性が考えられる。模擬ふき取り検体で、1ヶ月保存後もノロウイルス遺伝子が検出された。実際の事例において、ふき取り検査陽性の解釈に注意が必要と考えられる。

広島県の公共施設のトイレの拭き取り調査においても、2017/18シーズンのノロウイルス検出率は昨年度と比較して低く、当シーズンの感染性胃腸炎患者が少ない状況を反映しているものと考えられた。

カキが関連する食中毒事例から検出されるノロウイルスの遺伝子型はGIが比較的多いなど、必ずしも、ヒトで流行している遺伝子型や二枚貝以外の食中毒事例

や集団感染事例から検出される遺伝子型と一致するわけではない。そのため、二枚貝から検出されるノロウイルス遺伝子型とヒトから検出される遺伝子型に関するデータを蓄積することはカキ関連食中毒の予防や発生要因の解明に重要である。秋田県および川崎市の調査でカキとヒトから検出されたノロウイルスの遺伝子型に関連が認められた。秋田県の調査で、生カキのパック充填液からノロウイルスGII.17が検出され、交差汚染のリスクが示された。川崎市の調査で10月購入市販生食用カキ2検体および12月購入の1検体から、塩基配列がほぼ一致するGIが検出されたが、既知の遺伝子型に分類されなかった。遺伝子型が未分類であることから、報告数が稀な株であり、ヒトには感染しない又はヒトに対して病原性を持たないことが推測される。

(4) サポウイルス、ノロウイルスの培養法の検討

ヒトサポウイルスにおいて初めて培養上清中にウイルスRNAシグナルの増加、およびコピー数の経時的増加を認めた。しかしながら継代によるウイルスRNA増加はまだ認められておらず、初代培養上清からの超遠心法によるウイルス回収やその電顕像から考えられる要因を抽出し、現在検討を行っている。また、接種材料において、精製水で乳剤を調整したものにはウイルスRNAの増加を認めた検体はなく、分離用培地で調整したものにその増殖がみられる検体があった。このことから、接種材料の調整法に分離成功の可否が関連する可能性があり、詳細に検討する必要がある。

(高木研究分担報告)

ノロウイルスやサポウイルスの培養に必要と考えられる胆汁成分等の添加可能(細胞毒性を示さない)濃度は、細胞により異なり、新たに細胞株を検討する際には、それぞれの細胞で培養条件を詳しく検討する必要がある。

(上間研究分担報告)

2. 調理従事者からの二次汚染防止に関する研究

(1) ノロウイルスの不活化

今回、ネコカリシウイルスおよびマウスノロウイルスを用いて、天然生理活性物質120化合物について抗ノロウイルス活性の評価を行ったところ、14化合物が抗ウイルス活性を示した。しかし両ウイルスに効果を示す化合物はみつからなかった。今後も化合物のスクリーニングを継続し、抗ノロウイルス活性物質としての活用が期待される物質の探索を行う必要がある。

(小林研究分担報告)

(2) ウイルスの不活化法のガイドライン作成のための基礎研究

2年間にわたり、ヒトノロウイルス不活性化評価にかかる代替ウイルスの選定およびその方法について検討し、今回3種類のウイルス(ネコカリシウイルスF9株、ネコカリシウイルスym3株およびコクサッキーA6型ウイルス)をその候補として絞り込んだ。今後これらを用いての評価条件設定や市販製剤などによる評価の妥当性・再現性について検証する。

(高木研究分担報告)

コクサッキーB5型ウイルスはエタノールに対し高感受性であったことから、エ

タノール系消毒剤の評価のためのノロウイルスの代替ウイルスとしては不適切であると考えられた。

(上間研究分担報告)

(3) 効率的な手洗いの方法の検討

CMC液によるコーティングを実施して水洗いする方法が、最も手に残るファージ量が少なかったことから、トイレの前に手指をこれらのコーティング剤を塗布することで、トイレ後の手洗いにおいて、トイレ中のウイルスの手指汚染を効率的に洗い流すことができると考えられた。

(田村研究協力報告)

(4) ノロウイルス感染における臨床症状の把握

健康チェックを行っている食品関係事業者の多くは下痢や嘔吐、発熱を聞き取り項目としており、このチェックでは軽症感染を含む非典型的な症状の感染例を捉えることは困難であり、それらの症状を呈した例では、ノロウイルス感染がみ落とされるとともに、「不顕性感染者」として捉えられる可能性が考えられた。共通性の高い症状を把握できる健康チェック票を使用することにより、軽症感染を含む非典型的な症状を呈した場合でもノロウイルス感染を疑うことができ、感染者の発見がより容易になり、食中毒防止に寄与できるものと考えられた。

(野田研究分担報告)

(5) ノロウイルスの排便後の拡散の実証実験

食品取り扱い施設内においてトイレを使用する場合には、作業着の脱衣、靴の履き替え、手洗いの励行だけでは十分とは言えないと考えられた。致し方なく、

下痢時に食品取り扱い施設内のトイレを使用する時は、可能な限り汚染防止に注意を払い排便し、用便後は、最大限に念入りな手洗いを心がけるとともに施設の責任者に報告し、汚染防止対策を徹底することが肝要である。一方、トイレ使用時の手袋の着用は二次汚染防止策のひとつとして有用と考えられた。

(野田研究分担報告)

(6) 食品等の汚染ウイルス量の推定

2017年1月から2月に発生した刻み海苔関連食中毒事件の汚染源と推定される海苔の刻み作業を行った感染者の便中のウイルス量は、約 10^9 /g程度であったと推定された。この汚染量は一般的なノロウイルス感染者の便中のウイルス量と比較して、特段多いわけではなく、通常のノロウイルス感染者がこのような大規模食中毒を起こし得る可能性があると考えられた。

(野田研究分担報告)

E. 結論

1. 食中毒検査体制の強化に関する研究

- 9 機関を対象にノロウイルス定量検査の外部精度管理を実施した結果、食品検体を用いた際にも参加機関の評価を実施するに耐え得る統計量が得られた。
 - パンソルビン・トラップ法において、パンソルビン試薬のホルマリン固定の程度が弱い製品ではウイルス回収率が低下することが判明した。しかし、再固定プロトコルを付加することで、これまでどおり使用することができた。
 - 食中毒事例の調理従事者および患者から検出されたノロウイルスの塩基配列は、RT-PCR の検出プライマー内の配列
- 一致する同一事例内の検体は、VP1 全長などより長い配列を用いて比較してもほぼ一致したが、一部の事例において、通常と比較では見えなかった不一致が多く検出された事例もあった。
 - 昨年度開発した迅速簡便なふき取りからのウイルス検出法に食品添加物に指定されている Tween20 を用いることで一定のウイルス回収率が得られた。
 - カキからのノロウイルス検出法として開発したアセトン処理法における添加するアセトンおよびアミラーゼの量の至適化を行った。
 - 下水、患者、カキ等の二枚貝、施設拭き取り等からのウイルスの検出と遺伝子解析を実施し、食品媒介ウイルスの流行状況を把握した。
 - 下水中のノロウイルス汚染量は感染性胃腸炎患者の発生動向と概ね一致し、報告数と下水中のノロウイルス定量値に相関性がみられた。臨床検体と下水検体から検出される遺伝子型にも関連性がみられた。
 - 市販カキ等について検査したところ、カキに加え、浮遊液からもノロウイルスが検出された。
 - 市販生食用カキから未分類のノロウイルス GI が検出された。
 - 2016/17シーズンに流行したノロウイルスはGII. 2, GII. 17, GII. 4などが多い傾向にあった。
 - 食品や施設の拭き取りからのウイルス検出およびその塩基配列の比較が広域食中毒事件の調査に大きく寄与した。

- ふき取り検出期間に関する検討では、1ヶ月後の検体でも遺伝子が検出された。
- 食中毒事例において、無症状の調理従事者の中に約12%の不顕性感染者が認められた。
- 2014/15シーズン、2015/16シーズンに多発したGII.17、2016/17シーズンに多発したGII.2は、集団発生が起こる約3か月前から流入下水から検出された。
- 特定の細胞/コール酸の培養系でヒトサポウイルスにおいて培養上清中にウイルスRNAシグナルの増加およびコピー数の経時的増加を認めた。分離の成否に接種材料の調整法が関与している可能性が示唆された。
- 3種類の腸管系細胞株について、胆汁成分などの至適添加量を決定した。

2. 調理従事者からの二次汚染防止に関する研究

- CMC液による手指のコーティング法は水やハンドソープを用いた手洗いと比較して、手に残存するファージの量を1/10にすることが確認された。
- ヒトノロウイルス不活性化評価にかかる代替ウイルスの選定およびその方法について検討し、今回3種類のウイルス(ネコカリシウイルスF9株、ネコカリシウイルスym3株およびコクサッキーA6型ウイルス)をその候補として決定した。
- コクサッキーB5型ウイルスはエタノールに対し高感受性であり、エタノール系消毒剤の評価ではノロウイルスの代

替ウイルスとしては不適切であることが示された。

- ネコカリシウイルスおよびマウスノロウイルスを用いて、天然生理活性物質120化合物について抗ノロウイルス活性の評価を行ったところ、14化合物が抗ウイルス活性を示した。しかし両ウイルスに効果を示す化合物はみつからなかった。
- 健康管理において、ノロウイルス感染に比較的共通に認められる症状である胃部の異常、便性状の変化、倦怠感などを把握することがノロウイルス感染者の把握に重要である。
- ノロウイルスに感染した従事者がトイレで排便した場合、作業着の汚染を介して食品取扱室にウイルスを持ち込む可能性が示唆された。手袋を着用してのトイレの利用は、作業着等への汚染防止の手段として有用であった。
- 2017年1月から2月に発生した刻み海苔関連食中毒事件において、和歌山県御坊市での事例では一人が6,250コピーのノロウイルスを摂取したと推定された。海苔の刻み作業を行った感染者の便中のウイルス量は、約 10^9 /gであったと推定された。

F. 健康危害情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Hiroko Sato, Chihiro Shibata, Yoko Fujiya, Wakako Akino and Saito H: Epidemiology of scrub typhus in

- Akita Prefecture, 2007-2016. Infectious Agents Surveillance Report, 38 (6), 5-6 (2017)
- Hiroyuki Saito, Wakako Akino, Hiroko Sato, Yoko Fujiya, Chihiro Shibata, Ryoetsu Sato and Hiroyuki Shimizu: Isolation of enterovirus D68 using suckling mice. Infectious Agents Surveillance Report, 38 (10), 11-12 (2017)
 - Imamura S, Kanezashi H, Goshima T, Haruna M, Okada T, Inagaki N, Uema M, Noda M, Akimoto K. (2017)Next-Generation Sequencing Analysis of the Diversity of Human Noroviruses in Japanese Oysters., Foodborne Pathog Dis., Jun 8. doi: 10.1089/fpd.2017.2289.
 - Imamura S, Kanezashi H, Goshima T, Suto A, Ueki Y, Sugawara N, Ito H, Zou B, Uema M, Noda M, Akimoto K. (2017)Effect of High-Pressure Processing on Human Noroviruses in Laboratory-Contaminated Oysters by Bio-Accumulation., Foodborne Pathog Dis., Jun 8. doi: 10.1089/fpd.2017.2294.
 - 宗村佳子, 木本佳那, 小田真悠子, 永野美由紀, 奥津雄太, 森功次, 秋場哲哉, 貞升健志: 拭き取り検体からのノロウイルス遺伝子検出状況. 食品衛生学雑誌, 58(4), 201-204(2017)
 - 宗村 佳子, 木本 佳那, 小田 真悠子, 奥津 雄太, 加藤 玲, 鈴木 康規, 齊木 大, 平井 昭彦, 秋場 哲哉, 新開 敬行, 貞升 健志: 学校給食で提供された刻みのりによるノロウイルス食中毒. 食品衛生学雑誌, 58(6), 260-267(2017)
 - 上間匡, 野田衛 (2017)ノロウイルスによる食中毒, 公衆衛生, 81(6):
 - 入谷展弘, 上林大起, 改田厚, 阿部仁一郎, 山元誠司, 久保英幸, 平井有紀, 野田衛, 小笠原準: 2016-2017 シーズンに大阪市で認められたノロウイルス流行, 大阪市立環境科学研究所報告 調査・研究年報 79, 1-4 (2017)
 - 野田衛 (2017)改訂新版 ノロウイルス食中毒・感染症からまもる!!-その知識と対策-, 公益社団法人日本食品衛生協会, 1-156
 - 野田衛 (2017)刻み海苔を介したノロウイルス食中毒事件が教えてくれたこと, 国立医薬品食品衛生研究所報告, 135, 6-12
 - 野田衛 (2017)本邦初の刻み海苔を介した分散型広域ノロウイルス食中毒事件の全体像, 食品衛生研究, 67. 7-14
- ## 2. 学会発表
- Hiroyuki Saito, Yuko Shimizu, Hiroko Sato, Wakako Akino, Satoshi Hayakawa and Hiroshi Usijima : Immunological response in a patient of noroviruses infection associated with raw oyster. 第65回日本ウイルス学会学術集会, 2017, 大阪
 - 永田文宏, 上間匡, 濱島洋介, 寺柚

- 文男, 野田衛 (2017) パンソルビントラップ法による食品からのノロウイルスの検出, 第 113 回日本食品衛生学会学術講演会, 江東区, 2017
- 今村彩貴, 金指大海, 五島朋子, 須藤篤史, 植木洋, 菅原直子, 伊藤 博, 鄒碧珍, 上間匡, 野田衛, 秋元京子 (2017) 高压処理によるノロウイルス人為汚染カキの汚染低減効果, 第 38 回日本食品微生物学会学術総会, 徳島市, 10/5
 - 今村彩貴, 金指大海, 五島朋子, 須藤篤史, 植木 洋, 菅原直子, 伊藤博, 鄒碧珍, 上間 匡, 野田衛, 秋元京子 (2017) 高压処理による養殖カキ中のノロウイルス汚染低減効果, 第 113 回日本食品衛生学会学術講演会, 江東区, 11/9
 - 斎藤博之, 佐藤寛子, 早川智, 牛島廣治: 生カキ喫食後の胃腸炎症例におけるノロウイルス排泄状況と免疫応答, 第 58 回日本臨床ウイルス学会, 2017, 長崎
 - 斎藤博之, 秋野和華子, 佐藤寛子, 清水優子, 早川 智, 牛島廣治, 野田衛 (2017) ノロウイルス GII.17 に対するパンソルビントラップ・トラップ法の有効性に関する検討, 第 113 回日本食品衛生学会学術講演会, 江東区, 11/9
 - 斎藤博之, 秋野和華子, 佐藤寛子, 清水優子, 早川智, 牛島廣治, 野田衛: ノロウイルス GII.17 に対するパンソルビン・トラップ法の有効性に関する検討, 第 113 回日本食品衛生学会学術講演会, 2017, 東京
 - 斎藤博之, 秋野和華子, 佐藤寛子, 清水優子, 早川智, 牛島廣治, 野田衛: パンソルビン・トラップ法の捕捉抗体供給源としてのガンマグロブリンの再評価, 第 38 回日本食品微生物学会学術総会, 2017, 徳島
 - 斎藤博之, 秋野和華子, 佐藤寛子, 清水優子, 早川智, 牛島廣治, 野田衛: 生カキが原因でノロウイルスに感染した症例におけるノロウイルス排泄状況と抗体価の推移, 第 29 回秋田応用生命科学研究会講演会, 2017, 秋田
 - 宗村佳子: ノロウイルス食中毒一刻み海苔を原因とした大規模な即中毒事例を踏まえー. 第 113 回食品衛生学会学術講演会, 東京, 2017 年 11 月 10 日
 - 秋野和華子, 斎藤博之, 野田衛: 市販生カキにおけるノロウイルス汚染の定量的調査, 第 38 回日本食品微生物学会学術総会, 2017, 徳島
 - 小林孝行, 吉富秀亮, 中村麻子, 芦塚由紀, 梶原淳睦, 野田衛: 福岡県内で発生したノロウイルス G I . P c - G I . 5 による食中毒事例について, 第 43 回九州衛生環境技術協議会, 北九州市, 10 月 12 日, 2017
 - 小林孝行, 吉富秀亮, 中村麻子, 芦塚由紀, 梶原淳睦, 野田衛: 福岡県内の食中毒事例から検出されたノロウイルス G I . P c - G I . 5 の遺伝子解析, 第 38 回日本食品微生物学会, 徳島県, 10 月 5 日, 2017
 - 小林孝行, 吉富秀亮, 中村麻子, 芦塚由紀, 梶原淳睦, 野田 衛 (2017)

福岡県内の食中毒事例から検出されたノロウイルス GI. Pc-GI. 5 の遺伝子解析, 第 38 回日本食品衛生学会学術総会, 徳島市, 10/5

- 上間匡, 永田文宏, 野田衛 (2017) 糞便汚染指標としての Pepper mild mottle virus の評価, 第 113 回日本食品衛生学会学術講演会, 江東区, 11/9
- 谷澤由枝, 重本直樹, 高尾信一, 野田衛: ふき取り検体からのノロウイルス検出法の改良及び公共施設トイレにおけるノロウイルスのモニタリング, 第 38 回日本食品微生物学会学術総会, 2017, 徳島
- 中村麻子, 吉富秀亮, 小林孝行, 芦塚由紀, 梶原淳睦, 野田衛: 市販ノロウイルス検出イムノクロマトキットの遺伝子型別反応性評価, 第 64 回福岡県公衆衛生学会, 福岡市, 5 月 18 日, 2017
- 入谷展弘, 上林大起, 改田厚, 阿部仁一郎, 山元誠司, 久保英幸, 野田衛: 2016/17 シーズンに大阪市で認められたノロウイルス GII. 2 流行, 第 65 回日本ウイルス学会, 大阪 (2017. 10. 24-26)
- 高木弘隆, 永田文宏, 上間匡, 野田衛 (2017) 食品媒介性及び介在性ウイルスに関する不活性化評価手法の策定に向けた検討(1) - ヒトノロウイルス代替ウイルス選定に関する検討, 第 38 回日本食品微生物学会学術総会, 徳島市, 10/5

1. 特許取得: なし
2. 実用新案登録: なし
3. その他: なし

H. 知的財産権の出願・登録状況