

食材、食中毒関連情報の収集、地方衛生研究所における検証

研究分担者

愛媛県立衛生環境研究所 四宮博人

研究協力者

北海道立衛生研究所 吉澄志磨

宮城県保健環境センター 坂上亜希恵、植木 洋

埼玉県衛生研究所 岸本 剛

東京都健康安全研究センター 貞升健志

愛知県衛生研究所 皆川洋子

大阪健康安全基盤研究所 白井達哉、西嶋駿弥、左近直美

山口県環境保健センター 岡本玲子、調 恒明

福岡県保健環境研究所 田中義人

愛媛県立衛生環境研究所 豊嶋千俊、岩城洋己、山下育孝、青木紀子

研究要旨

食中毒原因ウイルスの食材・食品からの検出や同定は、食材を汚染しているウイルス量が少ない事や食品に含まれる夾雑物が検出を妨げる事などから困難な場合が多い。そのため原因食品や汚染経路の特定に至らず、効果的な対策を取るための知見も不足している。当分担当班は、食材や食中毒関連情報の収集及び本研究班で開発される高感度検出法の地方衛生研究所（以下、地衛研）における検証を担当しており、各種ウイルスの食品等への汚染経路、感染パターンの解明がすすめば、今後の予防対策に貢献できると考えられる。今年度は、原因ウイルスの追求が難しい場合が多く、ウイルス量が少ない食品・食材やふき取り検体について、地衛研で行われている前処理および濃縮・精製法について現状調査するとともに、食中毒における下痢症ウイルス検査に関しての要望等について情報を収集した。さらに、ノロウイルスを用いて、デジタル PCR による高感度検出を試行した。これらは今後の食中毒原因ウイルスの感染制御に向け、地衛研からの貢献において有益な基盤を提供するものと期待される。

A. 研究目的

食中毒の原因となるウイルスは、ノロウイルス、サポウイルス、ロタウイルス、レオウイルス、アイチウイルス、A 型・E 型肝炎ウイルス、アデノウイルス等、多くのウイルスが知られている。こ

れらによる食中毒は、事件数にして全体の 2 割、患者数にして全体の 5 割を占める。

ヒト検体から同定されたウイルスの遺伝子情報は、地方衛生研究所（以下、地衛研）と国立感染症研究所（以下、感染研）の連携により蓄積さ

れているものの、食中毒の原因と疑われる食材からのウイルスの検出や同定は、食材を汚染しているウイルス量が少ない事や、食品に含まれる夾雑物が検出を妨げる事などから困難な場合が多い。そのため原因食品や汚染経路の特定に至らず、効果的な対策を取るための知見も不足している。

このことから、様々な食中毒原因ウイルスについて効果的な予防策を検討するための知見を収集し、ガイダンス案を提示することが、本研究班としての目的である。

当分担任は、食材、食中毒関連情報の収集、地衛研における検証を担当し、各種ウイルスの食品等への汚染経路、感染パターンの解明がすすめば、今後の予防対策に貢献できると考えられる。さらには、地方自治体及び国レベルの関係部局の連携、情報共有、遺伝子検査手法の統一化等により、広域的な食中毒事案に共通する発生要因が明らかになる事が期待される。

今年度は、原因ウイルスの追求が難しい場合が多く、ウイルス量が少ない食品・食材やふき取り検体について、地衛研で行われている前処理および濃縮・精製法について現状調査するとともに、食中毒における下痢症ウイルス検査に関しての要望等について情報を収集した。さらに、ノロウイルスを用いて、デジタル PCR による高感度検出を試行した。

B. 研究方法

地衛研の状況を把握する目的で、原因ウイルスの追求が難しい場合が多く、ウイルス量が少ない食品・食材やふき取り検体について、どのような前処理および濃縮・精製法を実施しているか、について現状調査し、食中毒における下痢症ウイルス検査に関しての要望等（マニュアル、研修、情報還元、検体保管等）について情報を収集した。回答は愛媛県立衛生環境研究所に送付され、調査項目毎に集計された。

倫理面への配慮

本研究課題は、研究代表者及び研究分担者を研究者として、国立感染症研究所倫理審査委員会で審査され、承認された。また、当分担者を研究代表者、協力地衛研担当者を研究協力者として、愛媛県立衛生環境研究所倫理審査委員会で審査され、承認された。

C. 研究結果

全国 83 か所の地衛研のすべてから回答があった（回答率 100%）。内訳は、都道府県型 47 施設（大阪健康安全基盤研究所の天王寺センターと森ノ宮センターからはそれぞれ回答があり、合計 48 施設）、政令指定都市型（以下、政令市）19 施設、中核市・特別区型（以下、中核市等）17 施設である。調査結果について、項目別に以下に記す。

1. ウイルス量が少ない食品・食材やふき取り検体について、どのような前処理および濃縮・精製法を実施しているか

ウイルス量が少ない食品・食材やふき取り検体の前処理については、「実施していない」が最も多く、実施している中では、アミラーゼ処理、細菌添加法、リパーゼ処理の順に多かった（図 1）。

一方、濃縮・精製法については、超遠心法が最も多く、次いで、PEG 沈殿法、パンソルビントラップ法の順に多く、「実施していない」は少数であり（図 2）、何らかの方法でウイルス検出感度を高めようとしていることが明らかになった。

2. 食中毒における下痢症ウイルス検査に関しての要望等（マニュアル、研修、情報還元、検体保管等）

記載意見として情報収集し、末尾にまとめた。ノロウイルス以外の食中毒原因ウイルスについての検査マニュアルの整備、陽性コントロールの配布、食品からのウイルス検出法の改良、各種検査についての研修、食中毒事例の対応についての情報交換などがあげられた。

3. 食中毒原因ウイルスの高感度検出法の試み

ノロウイルスを用いて、デジタル PCR による高感度検出を試行した。5~5,000 copies/ μ L のレンジで検出可能であり、今後さらに検討を要する。

D. 考察

当分担班は、食中毒原因ウイルスの汚染が疑われる食材や環境水の収集と提供、及び食中毒事例や関連情報の収集と情報提供に関する地衛研の状況を把握するため、検査体制、検査項目、検体種類、検査方法、検査結果の行政処分における利用、環境サーベイランス、食中毒調査支援システム (NESFD) の利用等について調査を実施してきた。

昨年度の調査で、自治体での食中毒ウイルス検査において、地衛研が中心的な役割を担っていることが明らかにされた。地衛研で検査可能なウイルス種としては、ノロウイルス、サポウイルス、ロタウイルス、アストロウイルス、A 型肝炎ウイルス、E 型肝炎ウイルスなどである。

今回、原因ウイルスの追求が難しい場合が多く、ウイルス量が少ない食品・食材やふき取り検体について、どのような前処理および濃縮・精製法を実施しているか、について現状調査したところ、特に濃縮・精製法において様々な工夫がなされており、原因追及を求める姿勢やその過程での苦慮がうかがわれた。今後さらなる検出法の開発が望まれる。

食中毒における下痢症ウイルス検査に関しての要望等 (マニュアル、研修、情報還元、検体保管等) については、ノロウイルス以外の食中毒原因ウイルスについての検査マニュアルの整備、陽性コントロールの配布、食品からのウイルス検出法の改良、各種検査についての研修、食中毒事例

の対応についての情報交換などがあげられており、このような現場の声を今後の参考にしていく必要性が感じられた。

糞便等のヒト由来検体の検査に比べ、食材・食品や汚染水に対する検査方法は十分に確立しておらず、本研究班で予定されている、食材・食品や環境水からの食中毒原因ウイルスの高感度検出方法の開発が望まれ、各種ウイルスの食品等への汚染経路、感染パターンの解明がすすめば、今後の予防対策に貢献できると期待される。

E. 結論

地衛研は所属自治体の食中毒原因ウイルス検査において中核的な役割を担っており、各種ウイルスの食品等への汚染経路、感染パターンの解明がすすめば、今後の予防対策に貢献できると考えられる。ウイルス量が少ない食品・食材やふき取り検体について、地衛研で行われている前処理および濃縮・精製法について現状調査し、食中毒における下痢症ウイルス検査に関しての要望等について情報を収集した。これらは今後の食中毒原因ウイルスの感染制御に向け、地衛研からの貢献において有益な基盤を提供するものと期待される。

F. 健康危機情報

該当なし

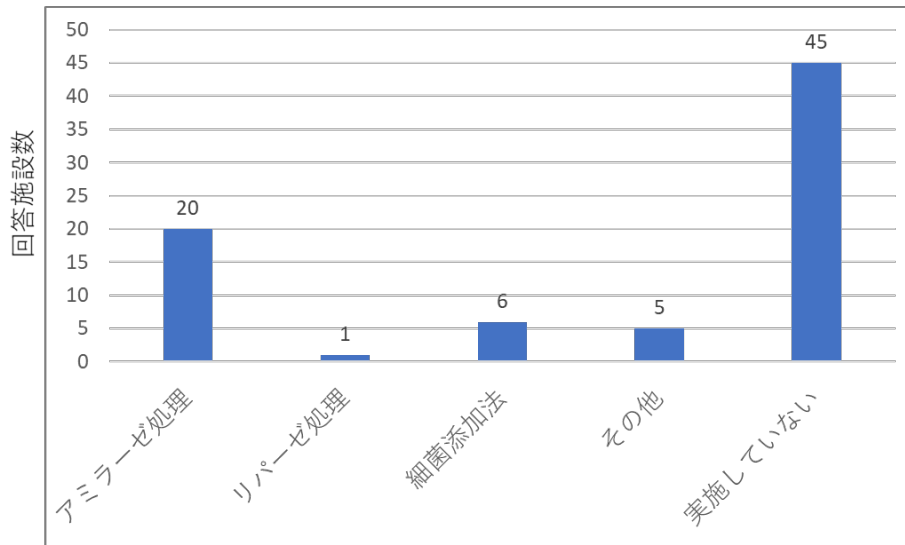
G. 研究発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

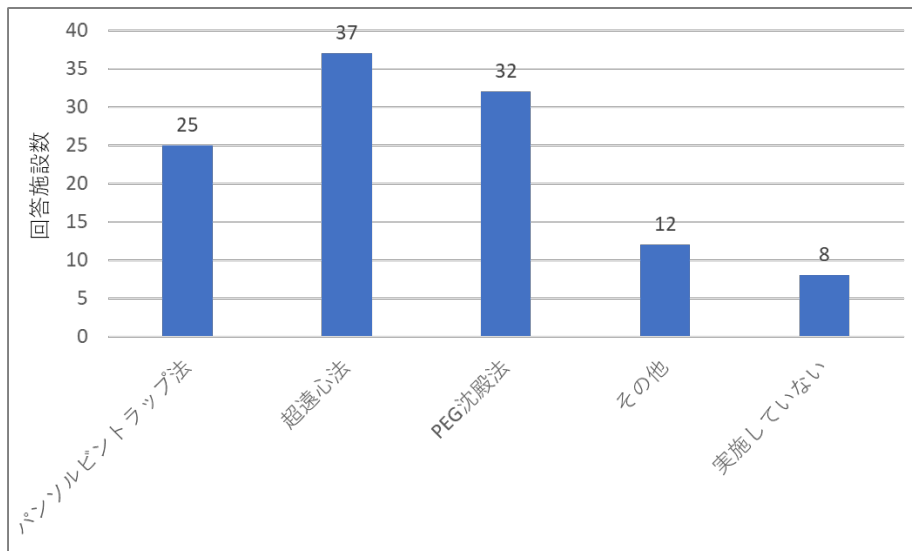
該当なし

図1. 食中毒原因ウイルスに関して、ウイルス量が少ない食品・食材やふき取り検体について、どのような前処置を実施しているか（複数回答可）



その他の内容（記載）：
 ・ふき取りは採取法を変更してもらう
 ・食品・食材の種類によっては、必要に応じて代替フロン処理
 ・スワブはキット内の液を全部捨てた後、ふき取りを行う
 ・キット（ふきとり）の使用
 ・ノロウイルスふき取り検査用キットを使用

図2. 食中毒原因ウイルスに関して、ウイルス量が少ない食品・食材やふき取り検体について、どのような濃縮・精製法を実施しているか（複数回答可）



その他の内容（記載）：
 ・細胞粉碎法（カキ）
 ・ふき取りは1mlに浮遊させ全量をHigh Pure Viral Nucleic Acid Large Volume Kitで核酸抽出
 ・ハイドロキシアパタイトに吸着
 ・グリコーゲン添加エタノール沈殿法
 ・遠心濃縮（Centriprep）
 ・浮遊液を捨てた容器で、採取した綿棒を搬送する
 ・ふき取り綿棒を少量のPBSに懸濁し絞り液からRNA抽出
 ・ふき取りはあらかじめ生食を減量している
 ・ふき取り検査用試薬キットの使用

食中毒における下痢症ウイルス検査に関する要望等(マニュアル、研修、情報還元、検体保管等)について(記載意見)(・は1地衛研分を示す)

都道府県

- ・ 検査は過熱直後に保存されたものが多く、有効な検体にはなりにくいので、盛り付け後の料理を保存するしくみがあればよい。
- ・ 感染症または食中毒の初動時対応の判断について他の地衛研ではどうしているのか知りたい。食中毒発生時の食品を検査する際のコツについて知りたい。
- ・ 通知法の早期の改訂が望まれる。
- ・ 食品からのウイルス検出もいくつか方法が示されているが、検査の安定性などに疑問があることから改良が望まれる。
- ・ ノロウイルス以外の検査マニュアルの整備
- ・ 研修(食中毒等集団発生時のノロウイルスの検査は、通知法はあるが、自治体によっては工夫をした独自の方法を実施しているところが多いため、情報交換をしたい)。外部精度管理。
- ・ 食中毒関連ウイルスの高感度・高精度かつ迅速なマルチプレックスリアルタイム PCR 法のマニュアルを開発してもらいたい。実習を含めた研修を国や研究班にて企画願いたい。(ブロック単位)
- ・ 現在、食品やふき取り検体からのノロウイルス検出をおこなっていないので、前処理方法や濃縮方法を含んだ検査法の研修を開催してほしい。食品検査と糞便検査それぞれの陽性判定基準や検査設備要件を統一的に著した食中毒検査マニュアルを作成してほしい。
- ・ 検査法に関する研修の開催を要望します。
- ・ 研修をやっていただけるとありがたい。系統樹解析やノロウイルス以外の食中毒事例への対応など。特に、担当者が頻繁に変更になるためこれまでの流れを理解しにくいところがあるので、流行株の推移や変異部分等を教えていただきたい。
- ・ 原因食品別の検出下限が整理してあれば、有用だと思います。
- ・ NESFD を活用しておりませんが、活用方法などを教えていただければと思います。広域食中毒についての早期探知にいかされるのでしょうか？ パンソルピントラップ法について通知法として残っているので、研修の実施や遺伝子型反応性が確認されたグロブリンの配布を必要時に送付してほしい。
- ・ 一つの窓口で、遺伝子検査が必要となる主要な下痢症ウイルスすべてのポジティブコントロールを配布して貰えるようなシステムになるとありがたいと思います。また、ホームページ等で利用可能なポジティブコントロールの種類が見れると助かります。
- ・ 病原体検出マニュアル「ノロウイルス」と厚生労働省通知「ノロウイルスの検出法」に記載される酵素・試薬等は統一されていればありがたいです。また、サポウイルス等とのマルチプレックスリアルタイム PCR 化をご検討いただきたいです。
- ・ サポウイルスの病原体検出マニュアルを作成していただきますとうれしいです。
- ・ 感染症法の検査マニュアルは改訂されているが、食品衛生法の検査法(通知法や食品衛生検査指針)は長い間更新されていない部分もあるため、最新の知見に基づき試薬等を含めて全体的に見直して頂きたい。
- ・ 病原体検出マニュアルの整備

政令市・中核市・特別区

- ノロウイルスの検査法について、ヒトを対象とした検査法（感染症発生動向事業）は病原体検出マニュアルとして整備されたが、食品等を対象とした検査法の最終改正は H25 年となっているため更新してほしい。また、ノロウイルスのみならず食中毒の原因となるウイルス全般のマニュアルを整備してほしい。
- サポウイルス、アストロウイルス、アイチウイルス等の検出マニュアルの整備をしてほしい。業務効率化のため下痢性ウイルスのマルチプレックスPCR方法について知見を共有してほしい。
- アストロウイルスやアイチウイルス等についても陽性コントロールの配布を希望します。
- 食中毒における下痢症ウイルス検査に関して、短時間で結果を求められるため、対応に困難を極めている。特に土日祝日。現在年末年始の休日に入っているが、このところ連日複数検査を抱え、なおかつ感染症の検査も入っており、対応が厳しい状況である。
- 食品検査についてのマニュアルの作成をお願いします。ノロウイルス以外の下痢症ウイルスのマニュアル改訂をお願いします。
- ノロウイルス以外のウイルスについては、マニュアル等が充実していない。また、定量リアルタイム PCR 系があっても、低コピー数の検体（従事者便や拭き取り等）の判定をどうすべきか苦慮している。A 型肝炎ウイルス等の分子疫学的解析結果について、NESFD では情報共有・還元が行われていない。
- 現在、レファレンスセンター未設置のウイルスについても、陽性コントロールの配布や情報提供等、今後の体制整備を希望します。
- ノロウイルス以外のマニュアルを更新してほしい。スタンダードやコントロールの分与の依頼先を示してほしい。
- 陽性コントロールの分与をお願いしたい。
- 本市では、検査室や安全キャビネット数の問題から、「食品・食材」と「便」の検査室や安全キャビネットを共有せざるを得ない。通常、食中毒が発生した場合は原因究明ために便・吐物から搬入されるため、コンタミネーションを懸念し食品・食材のウイルス検査は行っていない。このため、他の地研とのコンタミネーションに関する情報共有をお願いしたい。
- 本市でも、今後、ノロウイルス以外の食中毒原因ウイルスについて、検査を実施できるかどうか検討したいと考えています。同ウイルスの検査マニュアルの作成や研修等の実施があれば、よいと思います。