

平成 22 年度 収集情報

項目	内容
テーマ	市場に流通する二枚貝のノロウイルス汚染実態調査について
概要	<p>近年、ノロウイルスを原因とする食中毒は、調理従事者を原因とする二次汚染事例が多数を占めていた。しかし、平成 20 年、平成 21 年の全国の食中毒発生状況では、二枚貝を原因とする事例が多く発生していた。このことを受け、厚生労働省は平成 22 年 1 月に、ノロウイルス食中毒について通知を行った。</p> <p>都内でもこの傾向は変わらず、平成 21 年～22 年シーズンにおける、貝類が原因と推定された食中毒は 34%に達している。</p> <p>そこで、昨年度検討した東京都健康安全研究センターが開発した検査法（以下、開発法）を用いて、多摩地域の卸売市場に流通する二枚貝のノロウイルス汚染実態調査を実施した。</p> <p>厚生労働省の通知法ではノロウイルスは検出できなかったが、開発法では、112 検体中 14 検体（12.5%）が陽性であった。</p>
対象業種	一般消費者
今後の取組みの方向性	改めて二枚貝のノロウイルス対策について普及啓発を進める。
添付資料	<ul style="list-style-type: none"> ・市場に流通する二枚貝のノロウイルス汚染実態調査について（平成 21 年度健康安全研究センター先行調査発表会抄録） ・生食用かきを原因とするノロウイルス食中毒防止対策について（平成 22 年 1 月 22 日付食安監発 0122 第 1 号） ・ノロウイルス食中毒対策について（平成 19 年 10 月 12 日付食安発第 1012001 号） ・東京都のノロウイルス食中毒の発生要因（東京都食品監視課「東京都食中毒発生状況」をもとに作成） ・ノロウイルス失活を目的とした冷凍カキフライの加熱条件の検討について（平成 18 年度食品衛生監視員協議会全国大会抄録） ・細菌添加培養処理によるカキなどからのノロウイルス検出率の向上（食品衛生学雑誌 第 49 巻 第 6 号）

市場に流通する二枚貝のノロウイルス汚染実態調査について

1 調査目的

近年、ノロウイルス（以下「NV」とする）が原因とされる食中毒は、調理従事者を原因とする二次汚染事例が多数を占め、二枚貝を直接の原因とする事例は減少傾向にある。しかし、都のみならず全国でも、毎年、カキ等の二枚貝が原因とされる食中毒事件は発生しており、特に平成20年と21年はカキが原因とされるNV食中毒が多数発生した。このことから、依然として二枚貝はNV食中毒において注視すべき食品である。

現在、二枚貝を含む食品のNV検査は、厚生労働省通知による検査法（以下「通知法」）により実施されている。しかし、NV遺伝子の検査工程が食品由来成分に阻害される等の理由で、推定原因食品からNVが検出される例はきわめて少ないのが現状である。

市場監視係では、平成20年度先行調査として、東京都健康安全研究センターウイルス研究科が開発した検査法（以下「開発法」）を用いて「市場に流通する二枚貝のNV等の汚染実態調査」を実施した。その結果、開発法は通知法と比較して約20倍の検出率が得られ、二枚貝におけるNV検査において、その有効性が示唆された。

そこで、今年度は、二枚貝におけるNVの汚染状況をさらに明らかにするため、開発法を用いてカキのNV検査を継続し、昨年度の結果と合わせてカキに蓄積されるNVの季節的变化を考察した。また、赤貝やムラサキイガイを検査対象に加え、NV汚染実態調査を実施した。特に、赤貝は市場で「可食部（剥き身）」と中腸腺を含む「残渣」とに処理された後、販売されることが多いため、可食部（剥き身）と周囲への二次汚染の原因となる可能性があることから調査を実施した。さらに、生食用カキの出荷産地におけるNV対策実施状況等を把握するため、出荷団体を対象にアンケート調査を実施したので、ここに報告する。

2 調査内容

(1) 汚染実態調査

ア 調査期間

平成21年5月から平成22年2月まで

イ 調査対象

多摩地域の卸売市場に流通する岩カキ、生食用カキに加え、今年度新たに調査対象とした赤貝、ムラサキイガイ等の6品目112検体を購入し、検査対象とした。赤貝については、店舗内で「可食部（剥き身）」と中腸腺を含む「残渣」に分けたものを購入し、調査対象とした。

ウ 検査項目

ノロウイルス

エ 検査方法

通知法は、当該通知に基づき二枚貝の中腸腺部分を取り出した後、PBS（－）を加えホモジナイズし、10%乳剤を作製。これを遠心分離後、市販キットを用いてウイルスRNAの抽出

を行い、リアルタイム PCR 法による検索を行った。

開発法は、PBS (-) で作成した 10%乳剤に、細菌 (*Klebsiella oxytoca*) を添加後、35℃ 16 時間 (一晚) 培養し、以降は通知法と同様の処理をした。

なお、リアルタイム PCR の実測値 10 コピー以上のものを陽性 (+) と判断した。

(2) アンケート調査

ア 調査期間

平成 21 年 12 月初旬から 12 月末まで

イ 調査対象

平成 19 年時点、全国における養殖カキ出荷量の約 80% を占める広島県、宮城県、岡山県の計 53 漁協

ウ 調査方法

郵送または電話での聞き取り調査 (FAX での回答含む) による

エ 調査内容

生食用カキを出荷するにあたっての出荷条件、人工浄化装置の使用有無と使用目的、殻付きカキの剥き身処理作業時の処理水について、自主検査頻度、従業員教育

3 結果

(1) 汚染実態調査

開発法で NV が陽性となったものは、112 検体中 14 検体 (陽性率 12.5%) であり、通知法で陽性となったものはなかった (表 1)。

開発法で陽性となった検体は、生食用カキ 32 検体中 3 検体 (陽性率 9.4%)、加熱用生カキは 15 検体中 4 検体 (陽性率 26.7%)、ムラサキイガイは 18 検体中 1 検体 (陽性率 5.6%)、赤貝 20 検体中 1 検体 (陽性率 5.0%) であった。もっとも高い陽性率を示したのは加熱用冷凍カキであり、11 検体中 5 検体で陽性となった (陽性率 45.5%)。また、陽性となった 5 検体中 1 検体では GI・GII 共に陽性となった。岩カキでは、全ての検体において NV は検出されなかった。

加熱用冷凍カキ以外の検体の検査結果を購入月別に示した (表 2)。加熱用冷凍カキ以外の検体で、今年度 NV が検出されたのは全て 11 月~2 月であり、NV 食中毒が流行する時期と一致する結果となった。

表1 二枚貝のノロウイルス汚染実態調査結果

品目	検査数	通知法		開発法	
		陽性数	陽性率 (%)	陽性数	陽性率 (%)
岩カキ	16	0	0	0	0
生食用カキ	32	0	0	3	9.4
(殻付き)	15	0	0	1	6.7
(剥き身)	17	0	0	2	11.8
加熱用生カキ	15	0	0	4	26.7
加熱用冷凍カキ	11	0	0	5	45.5
赤貝(可食部及び残渣)	20	0	0	1	5.0
ムラサキイガイ	18	0	0	1	5.6
合計	112	0	0	14	12.5

※残渣から検出

表2 月別検査結果(陽性数/検査数)

品目	購入月										合計
	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	
岩カキ	0/3	0/3	0/3	0/3	0/4	-	-	-	-	-	0/16
生食用カキ	-	-	-	-	-	0/6	0/6	0/6	1/8	2/6	3/32
(殻付き)	-	-	-	-	-	0/3	0/3	0/3	0/3	1/3	1/15
(剥き身)	-	-	-	-	-	0/3	0/3	0/3	1/5	1/3	2/17
加熱用生カキ	-	-	-	-	-	0/3	1/3	0/3	1/2	2/4	4/15
赤貝(可食部及び残渣)	0/3	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	1/1	1/20
ムラサキイガイ	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	1/1	0/1	1/18
合計	0/8	0/7	0/7	0/7	0/8	0/13	1/13	0/13	3/13	5/12	

(2) アンケート調査

全国における養殖カキの出荷量の約80%を占める、広島県、宮城県、岡山県の計53漁協を対象にアンケート調査を実施したところ、生食用カキを取り扱っている漁協は37漁協であり、このうち28漁協(75.7%)から回答を得た。

<参考>生食用カキ出荷のフロー



ア 生食用カキの出荷条件

全ての漁協において、生食用カキの規格基準に適合することに加え、養殖海域及び製品からNVを検出しないことと規定していた。なお、食品衛生法より厳しい基準を条例等で定めている自治体は無いものの、3県中2県が出荷生産管理において要領や指針の作成等厳しい取扱い方法を定めていた。

イ 人工浄化装置

人工浄化装置を設置している漁協は75.0%(21/28)であった。設置目的としては、「細菌(細菌数、大腸菌群、腸炎ビブリオ等)の除去」が90.5%(19/21)と最も多く、NVの除去を目的に浄化装置を設置している漁協は9.5%(2/21)であった。

人工浄化時における使用水の殺菌・滅菌方法は、無回答を除く21漁協のうち、多い順に「塩素のみ使用」42.9%(9/21)、「紫外線と塩素を併用」33.3%(7/21)、「塩素とオゾンを用併用」14.3%(3/21)、「紫外線のみ」「その他」がそれぞれ4.8%(1/21)であった。

浄化時間について、無回答を除く15漁協のうち、県の要領や指針(20~24時間)に基づき実施している漁協は60%(9/15)、20時間以下で実施している漁協が40%(6/15)であった。

ウ 剥き身処理工程における使用水

使用水に何らかの殺菌・滅菌処理をすると回答した漁協は92.9%(26/28)で、清浄海域から取水した海水または成分規格に適合した人工塩水を使用すると回答した。そのうち塩素のみで処理すると回答した漁協は61.5%(16/26)であり、塩素と紫外線の両方法を用いて処理をすると回答した漁協は38.5%(10/26)であった。

エ 生食用カキの自主検査

県が定めた漁獲海域を1ロットとして、NV検査においては週1回、成分規格の検査においては月2回、全漁協で実施していた。製品の検査によりNVが検出された場合、その後実施される製品の検査で適正と判断されるまで7日間~10日間生食用としての出荷は見合わせ、加熱用として出荷するとのことであった。

オ 従業員の衛生教育

剥き身処理に携わる従業員の衛生教育については、全ての漁協において、保健所等の行政職員による講習会をシーズン始めに1回受講すると回答した(28/28)。また、検査項目にNVを含む検便検査を実施している漁協は92.9%(26/28)であり、検便検査を実施しないと回答した漁協もあった。検便検査の検査頻度は、「シーズン始めに1回」と回答した漁協が80.7%(21/26)、次いで「シーズン中(5ヶ月間)2回」と「1ヶ月1回」がそれぞれ7.7%(2/26)であった。

3 考察

(1) 二枚貝の NV 汚染実態調査

検査法の違いによる陽性率を比較すると、通知法では 0% (0/112) であったのに対し、開発法では 12.5% (14/112) であった。特に、加熱用冷凍カキにおいては陽性率の違いが顕著で、通知法では 0% (0/11) であったのに対し、開発法では 45.5% (5/11) であった。したがって、昨年同様、開発法は通知法に比べて検出感度が優れており、二枚貝の NV 汚染実態を把握するのに有効であるといえる。今後、開発法による生食用カキの NV 検査を実施していくことが必要である。

開発法における生食用カキの陽性率を、昨年度の結果と比較した。昨年度は 11月 0% (0/3)、12月 12.5% (1/8)、1月 33.3% (3/10)、2月 45.4% (5/11) であったのに対し、今年度の結果では、11月 0% (0/6)、12月 0% (0/6)、1月 12.5% (1/8)、2月 33.3% (2/6) であった。いずれの年度も 2月に向けて陽性率が上昇する傾向が見られたが、今年度の陽性率は、昨年度の陽性率と同様の値が 1ヵ月遅れて検出されていた (図 1)。

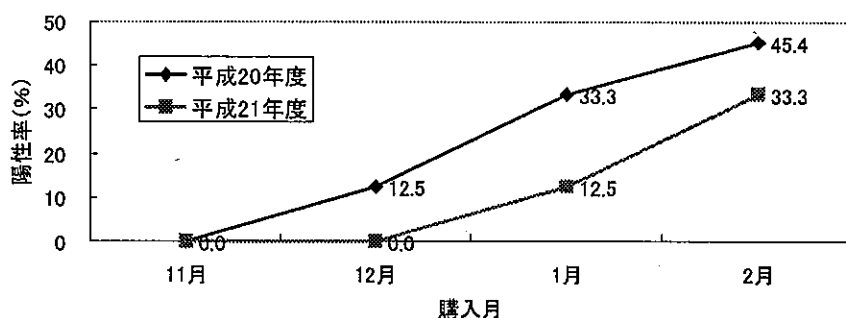


図1 開発法における生食用カキ陽性率

例年、NV を主とする感染性胃腸炎の発生のピークは 12月 (50 週前後) であるが、今年度は 1月後半 (4 週前後) と、例年と比較して全国的に 1ヶ月程度遅れているとの報告がある。生食用カキの主要生産地域でも同様の報告が出されており、本調査結果が今年度特有の感染性胃腸炎の発生時期をある程度反映しているものではないかと考えられる。感染性胃腸炎が流行した後約 1ヶ月後にカキの NV が陽性となったとの報告¹⁾もあることから、今年は、3月から 5月が水揚げの旬とされる加熱用冷凍カキが NV に濃厚汚染されてくる可能性がある。したがって、加熱不足や調理時の二次汚染による NV 食中毒防止対策に努めていくことが重要である。

加熱調理用カキ、加熱用冷凍カキ、ムラサキガイに加えて、昨年度の調査で NV が検出されたシジミ、ホンビノス貝は、通常加熱調理して食するものであるが、市場内での取り扱いや陳列方法について二次汚染防止の観点から注意指導していく必要がある。特に、冷凍カキは冬季に関わらずノロウイルスが陽性となっており、年間を通して NV 食中毒予防に努めていくことが重要である (表 3)。

表3 加熱用冷凍カキ月別陽性数(陽性数/検査数)

品目	購入月										合計	陽性率 (%)
	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月		
加熱用冷凍カキ	2/2	0/1	0/1	0/1	1/1	1/1	0/1	1/1	0/1	0/1	5/11	45.5

(2) 赤貝の汚染実態調査

可食部 (剥き身) については全検体から通知法、開発法共に NV は検出されなかった。残渣については、通知法では NV は検出されなかったものの、開発法では 20 検体中 1 検体 (陽性率 5.0%) が陽性であった。

赤貝は、客の依頼により市場内店舗で可食部 (剥き身) と残渣に処理された後、販売されるこ

とがある。そのため、市場内営業者に対し二次汚染防止対策の徹底を指導することが重要である。

(3) アンケート調査

生食用カキを出荷するにあたり、各県ごとに要領や指針の作成等厳しい取扱い方法を定め、行政指導を行っているにもかかわらず、人工浄化装置を県の要領や指針より短い時間で実施している漁協が40% (6/15) あったことや、検便を実施していない漁協もあり、生産者側と行政側との衛生意識には差があるように感じられた。また、人工浄化装置を普及していない漁協が25.0% (7/28) であることからしても、生産者側の衛生意識の向上とさらなる情報提供及び指導が必要と考えられた。

また、カキを原因とするNV食中毒は依然として全国で発生しており、本調査での開発法における生食用カキのNV陽性率でも、20年度調査で23.7%、21年度で9.4%となった。よって、出荷団体での衛生管理体制で取り除くことのできないNVに汚染されたカキが、市場に流通している可能性が考えられた。平成22年1月22日付けの厚生労働省通知「生食用かきを原因とするNV食中毒防止対策について」においても、平成20年及び平成21年において、貝類を原因とする食中毒が特に増加傾向にあることを受けて、生産海域の環境衛生の監視を強化する旨が通知されている。したがって、出荷地域における更なる環境衛生の向上のためには、養殖海域を含めた周辺地域にわたる食品及び環境衛生の監視強化とともに、NV検出率のより高い検査法の導入の検討等が求められる。

さらには、出荷地域における衛生管理体制の中でNVに汚染されたカキを排除しきれなかった場合、市場に流通する可能性があることを消費者及び生産地にどのように情報提供していくかが今後の課題である。

5 まとめ

- ① 112検体中14検体（陽性率12.5%）が開発法で陽性となり、昨年同様、二枚貝のNV汚染実態を把握するのに通知法に比べて開発法が有効であることが示唆された。
- ② 生食用カキを出荷するにあたり、生産地域での食品及び環境衛生の監視強化が重要であるとともに、消費者に正しい調理方法や二次汚染防止対策等を情報提供していくことが必要である。
- ③ 赤貝は20検体中1検体（5.0%）が開発法で陽性となった。そのため、店舗内で処理する際には夏場の腸炎ビブリオ対策と同様に、NVの二次汚染防止に努めるよう市場内営業者に対し指導していきたい。

6 参考文献

- 1) 西尾 治, 中川 (岡本) 玲子 : 臨床とウイルス 2008 10 Vol. 36 No. 4 : 305-314,



食安監発0122第1号

平成22年1月22日

各

都道府県
保健所設置市
特別区

 衛生主管部（局）長 殿

厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長

生食用かきを原因とするノロウイルス食中毒防止対策について

標記については、平成19年に開催された薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会食中毒部会で取りまとめられた「ノロウイルス食中毒対策（提言）」（平成19年10月12日付け食安発第1012001号）において、二枚貝の生産地における定期的な検査の実施等による生産海域の環境衛生の監視に努めることが重要である旨の提言がなされているところです。

しかしながら、平成20年及び平成21年のノロウイルス食中毒発生状況を見ると、事件総数が減少傾向にあるのに対し、貝類を原因食品（推定を含む。）とする食中毒は増加傾向を示しております（別添参照）。

つきましては、当該状況を踏まえ、各都道府県等においては、必要に応じて水産部局とも連携し、生食用かきの関係事業者に対するノロウイルス防止対策の監視指導を監視指導計画に反映するなど、ノロウイルス食中毒の発生防止に努めるようお願いいたします。

(別添)

原因食品別にみたノロウイルス食中毒事件数年次推移

	平成13年	平成14年	平成15年	平成16年	平成17年	平成18年	平成19年	平成20年	平成21年 (速報)
総数	269	268	278	277	274	499	344	303	197
魚介類	98	83	73	39	45	26	14	23	25
貝類 (総数に占める割合)	94	81	70	38	42	22	8 (2.3%)	20 (6.6%)	25 (12.7%)
魚介類加工品	1	3	0	1	3	0	0	0	0
肉類及びその加工品	0	1	1	1	1	1	1	1	0
卵類及びその加工品	0	0	0	0	0	0	0	1	0
乳類及びその加工品	0	0	0	0	0	0	0	0	0
穀類及びその加工品	0	3	3	2	3	3	3	1	0
野菜及びその加工品	0	2	1	1	1	2	2	1	2
菓子類	1	0	2	2	3	3	7	4	3
複合調理食品	9	11	15	21	19	77	46	37	18
その他	106	131	145	162	172	310	240	202	126
食品特定	6	3	6	4	5	11	7	4	4
食事特定	100	128	139	158	167	299	233	198	122
不明	54	34	38	48	27	77	31	33	23

食安発第 1012001 号
平成 19 年 10 月 12 日

各

都道府県知事
保健所設置市長
特別区長

 殿

厚生労働省医薬食品局食品安全部長

ノロウイルス食中毒対策について

平成 18 / 19 年シーズンにおいて、ノロウイルスによる食中毒及び感染症の発生が大幅に増加したことに鑑み、平成 19 年 8 月 17 日及び 9 月 21 日、薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会食中毒部会が開催されたところである。

本部会において、昨シーズンの発生状況等が分析、検討され、今シーズンに向けて別添のとおり「ノロウイルス食中毒対策（提言）」が取りまとめられた。

については、今後、貴地方公共団体において、本提言を踏まえ、関係者がノロウイルスによる食中毒の発生防止に努めるよう関係者を指導するとともに、食中毒調査の適切な実施等について特段の対応をお願いする。

ノロウイルス食中毒対策について（提言）

平成 19 年 10 月 12 日
薬事・食品衛生審議会
食品衛生分科会食中毒部会

薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会食中毒部会を平成 19 年 8 月 17 日及び 9 月 21 日に開催し、平成 18 年／19 年シーズンのノロウイルスによる食中毒及び感染症の発生状況を分析、評価するとともに、調理従事者等（食品の盛り付け・配膳等、食品に接触する可能性のある者を含む。）を原因とするノロウイルス食中毒の発生防止対策等に関する本部会の意見を下記のとおりとりまとめた。

1 ノロウイルスの特徴

(1) 病原体及び病原性

- ① ノロウイルスはカリシウイルス科に属するウイルスであり、Genogroup I（G I）と Genogroup II（G II）の 2 つの遺伝子群に分類され、さらにそれぞれ 15 と 18 あるいはそれ以上の遺伝子型（genotype）に分類される。
- ② 潜伏期間は、1～2 日であると考えられており、嘔気、嘔吐、下痢が主症状であるが、腹痛、頭痛、発熱、悪寒、筋痛、咽頭痛、倦怠感等を伴うこともある。特別な治療を必要とせず軽快するが、乳幼児や高齢者及びその他体力の弱っている者では下痢による脱水や嘔吐物による窒息に注意する必要がある。ウイルスは、症状が消失した後も一週間ほど（長いときには 1 ヶ月程度）患者の便中に排出されるため、2 次感染に注意が必要である。
- ③ 感染は現在の検出感度を下回る 10～100 個の極微量のウイルスを摂取することで成立するとされている。また、地方衛生研究所からの報告によると、平成 17 年以降の食中毒事例において、原因食品（推定を含む）中のウイルス RNA 量が定量された検体は 7 例（生かき 3 検体、しじみ醤油漬 2 検体、大根ナムル 1 検体、かやくご飯おかゆ 1 検体）あり、定量値は、38.8～13,000 コピー/g であった。

(2) 疫学

- ① 平成 18 年ノロウイルス食中毒発生状況
 - ・ 平成 18 年のノロウイルス食中毒は、事件数 499 件、患者数 27,616 名（平成 17 年と比較して、事件数が 225 件、患者数が 18,889 名増）であった。その内、患者数が 500 名以上の事例は、6 件（5,118 名）であり、都道府県等からの報告によると、発生原因については、すべての事例においてノロウイルスに感染した調理従事者等が汚染源と推察されている。

- ・ 月別発生状況は、10月が27件(1,475名)であったが、11月から急増(124件、6,220名)し、12月は150件(11,547名)であった。
 - ・ 原因食品は、食事等が310件(17,795名)、複合調理食品が77件(5,547名)、魚介類が26件(420名)の順で多かった。
 - ・ 原因施設は、飲食店が288件(10,905名)、旅館が92件(5,436名)、仕出屋が55件(8,356名)の順で多かった。
- ② 感染症発生動向調査(週報)
- ・ ノロウイルスは、感染症発生動向調査の中で冬期の感染性胃腸炎関連ウイルスとして集計されており、昨年末は例年より1ヶ月程度早く10月中旬から流行が始まり、11月、12月の2ヶ月は過去10年間の報告数では最大の規模の患者発生が見られた。
 - ・ 地域別の発生状況については、大まかな傾向として、九州及び中国地方の西日本から流行が始まり、近畿、中部、四国、そして関東、東北の東日本が遅れて流行が起こったように見られた。
- ③ 病原微生物検出情報(月報)
- ・ 病原微生物検出情報には、地方衛生研究所で検査されノロウイルスと確認されたものが集計されており、平成18年10月～平成19年6月4日までに地方衛生研究所から国立感染症研究所感染症情報センターに報告された食中毒又は感染症由来の3,669株のうち、93%(3,448株)はGⅡに属するノロウイルスであった。
 - ・ 検出されたノロウイルスの約22%(788株)が遺伝子型別された。型別された株のうち、GⅡ、遺伝子型4(GⅡ/4)が92%(727株)を占め、流行したノロウイルスのほとんどがGⅡ/4であったと考えられる。
 - ・ 8ヶ所の地方衛生研究所で検出されたGⅡ/4の構造蛋白領域の遺伝子解析から、GⅡ/4は大きく3つのクラスターに分けられたこと、そのうち2つはヨーロッパ2006a及びヨーロッパ2006bと呼ばれる新型タイプであったこと、いずれの地方衛生研究所でもヨーロッパ2006bタイプが主流で、このタイプはこれまでのシーズンにおいて我が国では検出されていないことが特徴としてあげられる。

(3) 分子疫学的解析

- ① 平成17年11月～平成18年12月の間、散発及び集団発生があった55事例について、調理従事者等2,376名の糞便をリアルタイムPCR法でスクリーニング検査し、449名(19%)からノロウイルスが検出された(GⅠ:26名(5.8%)、GⅡ:423名(94.2%))。
- ② 調理従事者等の糞便中に検出された株は、GⅡ/4が主流であったが、GⅡ/3など他の株も検出され、同一人物で異なる株が検出される混合感染例も認められた。

- ③ ウイルス排泄量の平均値は糞便 1 グラムあたり G I が 2.79×10^7 コピー、G II が 3.81×10^8 コピーであり、G II/4 と他の G II 株とのウイルス排泄量の違いは認められなかった。また、調理従事者等からは症状の有無にかかわらず、同レベルの量のウイルスが検出された事例もあり、不顕性患者も発症者と同レベルのウイルス量を排出しうることが示唆された。

(4) 感染経路等

- ① ノロウイルスの感染者の糞便は 1 グラム当たり数億個ものウイルスを含み、一方、僅かに 10～100 個のウイルスで十分に感染が成立する。このことは、単純計算で、便 0.1 グラムで数百万人も感染を起こし得る事になる。加えて、このウイルスは環境中で安定している。従って、調理従事者等がノロウイルスに感染すると、患者から排出されたウイルスから容易に食中毒が発生する可能性がある。
- ② ノロウイルスを不活化する方法としては、 $85^{\circ}\text{C} \cdot 1$ 分間以上の加熱及び次亜塩素酸ナトリウムの使用が有効である。
- ③ こうした知見を踏まえ、以下のとおり食中毒の発生及び拡大防止策等を示す。

2 発生及び拡大防止対策

(1) 下水等環境汚染対策

- ① ノロウイルスについては、人の腸管内のみで増殖し排泄され、これらが下水処理で除去されなかった場合、河川から海に流れ込み、二枚貝に蓄積し汚染させる可能性がある。よって、二枚貝の汚染を防止するためには、糞便等に汚染された水を適切に下水処理することが効果的な手段の一つであると考えられる。このことから、かきなどの二枚貝を生産する海域においては、市町村等は、糞便等に汚染された水の適切な下水処理の普及がなされるよう努める。
- ② 二枚貝の生産地においては、定期的な検査の実施等により生産海域の環境衛生の監視に努める。

(2) 調理施設等の衛生対策

- ① 施設内のトイレについては、定時的に清掃及び次亜塩素酸ナトリウム等による消毒を行って衛生的に保つ。
- ② 冷蔵庫の取っ手、調理施設内の排水溝及びトイレのドアノブについては、ノロウイルスによる汚染実態が明らかとなっていることから、調理施設の清掃・消毒、特に手指の触れる場所及び調理器具の洗浄・消毒を徹底する。

(3) 調理従事者等の感染予防対策

- ① 調理従事者等は、トイレ及び風呂等における衛生的な生活環境の確保、流行期には十分に加熱された食品を摂取する等により感染防止に努めるとともに、徹底した手洗いの励行を行うなど自らが施設や食品の汚染の原因とならないように注意す

る。また、調理従事者等は体調に留意し、健康な状態を保つように努める。

- ② 調理施設においては、調理従事者等は飲食店等の利用者とは別の専用トイレを設けること望ましく、使用後は流水・石けんによる手洗い（1回では不十分な可能性があるため2回以上）が不可欠である。
- ③ トイレ後は使い捨てペーパータオルを使用して手を拭き、タオル等の共用はしない。
- ④ 施設管理者は調理従事者等を含め職員の健康状態の把握を組織的・継続的に行い、調理従事者等の感染及び調理従事者等からの施設汚染の防止に努める。

(4) 調理時等における汚染防止対策

- ① 下痢又は嘔吐等の症状がある調理従事者等については、直ちに医療機関を受診し、感染性疾患の有無を確認する。感染性疾患による症状と診断された調理従事者等は、調理等への従事を控えるとともに、下痢又は嘔吐等の症状がなくなっても、ウイルスが一定期間排出される可能性を考慮し、食品に直接接触する調理作業を1ヶ月程度控えるなど適切な処置をとることが望ましい。
- ② 常に手洗い専用の設備を使用して、調理等の前及び調理中の流水・石けんによる手洗い（1回では不十分な可能性があるため2回以上）を徹底するとともに、使い捨て手袋を活用する。
- ③ 大量調理施設の調理従事者等については、発症した調理従事者等と一緒に喫食するなど、同一の感染機会があった可能性がある調理従事者等について検便を実施し、検査の結果ノロウイルスを保有していないことが確認されるまでの間、調理に直接従事することを控えさせる等の手段を講じるべきである。

(5) 拡大防止対策

- ① ノロウイルス感染者の嘔吐物及び糞便には、ノロウイルスが大量に含まれることから、調理施設及び関係施設（飲食店の客席、旅館及びホテルの宴会場、ロビー、通路など）において利用者等が嘔吐した場合には、次亜塩素酸ナトリウムを用いて迅速かつ適切に嘔吐物の処理を行う。
- ② 食中毒が発生した時、原因究明を確実にを行うため、原則として、調理従事者等は当該施設で調理され、顧客に提供されたものと同じ食品を喫食すべきでない。

(6) 危機管理体制の整備

高齢者や乳幼児が利用する社会福祉施設、保育所等においては、平常時から施設長をトップとする危機管理体制を整備し、感染拡大防止のための組織対応を考えておく。

(7) 普及啓発及び衛生教育

- ① 国及び都道府県等はノロウイルスに関する正しい知識及び情報の提供を行うとともに、事業者に対する衛生教育を充実する。
- ② 事業者は、ノロウイルスに関する正しい知識を習得し、従業員への衛生教育に努

める。

3 食中毒・感染症調査の適切な実施

(1) 調査において留意すべき事項

- ① 食中毒か感染症かの判断を行う前に、食品衛生担当部局と感染症担当部局においては発生当初から情報を共有するとともに、疫学的な調査マニュアルに基づいて科学的に共同調査を行う。
- ② 患者、喫食者及び調理従事者等の関係者、調理施設及び設備並びに食材等について、試験検査を実施し、他の原因の可能性も除外することなく、ノロウイルスの検出に努めるとともに、患者家族等関係者における発症状況、患者の行動状況等の疫学調査を実施し、感染原因の解明に努める。
- ③ 調査にあたっては、調査対象者に対し調査に関する正しい理解を求めるため、十分な説明を行うとともに、調査結果についても、風評被害防止の観点から正確な情報を公表する。

(2) 食中毒の判断根拠の明確化

- ① 病因物質、原因施設、原因食品、原因食材、汚染源及び汚染経路については、「食中毒処理要領」及び「食中毒調査マニュアル」に基づき調査を実施し、その結果、食中毒と判断する場合には、ノロウイルス感染者との濃厚接触、及びノロウイルス感染者の糞便又は嘔吐物による塵埃あるいは環境を介した感染でない根拠を明確にする必要がある。
- ② 調査の結果、調理従事者等の検便によりノロウイルスが検出された場合であっても、これが原因の食中毒と判断する場合には、a)喫食調査結果において患者の共通食事等が限定されていること、b)流行曲線が一峰性で時間的、空間的に集積性があること、c)他の患者の嘔吐物及び糞便に曝露された結果の感染であることが除外されること、d)患者と調理従事者等から検出されたウイルスの遺伝子型が同一であること（調理従事者等が被害者となって感染した場合には同一になるため注意が必要）等に加え、e)調理従事者等が患者に先んじて発症していること、f)調理従事者等が共通食を喫食していないこと等を確認する必要がある。
- ③ ただし、食中毒と人から人への感染の混在、複数の株のウイルスが混在する食材による感染の可能性もあることから、上記の条件が整わなくとも食中毒を否定することはできない。このため、最終的に食中毒と判断しない場合であっても、施設の消毒及び衛生管理の徹底等必要な措置を行政指導する。
- ④ 食中毒と判断され、食品衛生法に基づき営業禁止又は停止等の行政処分を行う際には、当該事業者に対し、推定される感染経路等原因究明結果を丁寧に説明するとともに、公益上、緊急に営業禁止又は停止等の行政処分を行う必要がある場合を除

き、行政手続法に基づき事業者に弁明の機会が設けられることを伝える。

4 発生状況の迅速な把握

(1) 国は、都道府県等からの感染性胃腸炎、ノロウイルス感染症及び食中毒疑い例の迅速な報告を徹底するとともに、発生状況に応じた対策を検討する。

(2) 都道府県等は、ノロウイルス感染症及び食中毒疑い例の発生の迅速な把握に努めると共に、保健所等による積極的な調査及び調査に必須である地方衛生研究所等による病原体検査を速やかに実施する体制を整備する。

また、患者等から分離されたウイルスに関する情報については、速やかに病原微生物検出情報として国立感染症研究所に報告する。

(3) 調理施設、社会福祉施設、保育所等においては、従業員あるいは利用者において下痢・嘔吐症の発生を迅速に把握するために、定常的に有症状者数を調査するサーベイランスを行うことが望ましい。

また、ノロウイルス感染症又は食中毒を疑う状況が発生した際は、速やかに保健所等へ報告する。

5 調査研究

ノロウイルスの高感度・迅速検出法及び不活化方法の開発、食品のノロウイルス汚染実態調査、調理従事者等の不顕性感染の実態調査、嘔吐物等による感染の疫学的分析等に関する調査研究を進める。

【関係情報】

1 厚生労働省

- ノロウイルスに関する Q&A
<http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/kanren/yobou/dl/040204-1.pdf>
- ノロウイルスの検出法について
<http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/kanren/kanshi/031105-1.html>
- 食中毒・食品監視関連情報
<http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/index.html>
- 高齢者介護施設における感染対策マニュアル
<http://www.mhlw.go.jp/topics/kaigo/osirase/tp0628-1/index.html>

2 国立感染症研究所感染症情報センター

- 感染症の話 ノロウイルス感染症

http://idsc.nih.go.jp/idwr/kansen/k04/k04_11/k04_11.html

- ノロウイルス感染症とその対応・予防（家庭等一般の方々へ）
<http://idsc.nih.go.jp/disease/norovirus/taio-a.html>
- ノロウイルス感染症とその対応・予防（医療従事者・施設スタッフ用）
<http://idsc.nih.go.jp/disease/norovirus/taio-b.html>
- ノロウイルスの感染経路
<http://idsc.nih.go.jp/disease/norovirus/0702keiro.html>
- 感染症発生動向調査週報（IDWR）
感染性胃腸炎 過去10年間との比較グラフ（週報）
<http://idsc.nih.go.jp/idwr/kanja/weeklygraph/04gastro.html>
- 病原微生物検出情報（IASR）
 - ・ <速報>ノロウイルス感染集団発生 2006/07 シーズン
<http://idsc.nih.go.jp/iasr/noro.html>
 - ・ 最新のウイルス検出状況・グラフ1（地研からの報告）
<http://idsc.nih.go.jp/iasr/prompt/graph-kj.html>
 - ・ 最新のウイルス検出状況・集計表（地研からの報告）
<http://idsc.nih.go.jp/iasr/virus/virus-j.html>

3 国立医薬品食品衛生研究所

- 海外におけるノロウイルス関連情報
<http://www.nihs.go.jp/hse/food-info/microbial/noroindex.html>

4 国立保健医療科学院

- 厚生労働科学研究成果データベース
<http://mhlw-grants.niph.go.jp/>
 - ・ ウイルス性食中毒の予防に関する研究（平成16～18年度）
（主任研究者：武田直和 国立感染症研究所ウイルス第二部）

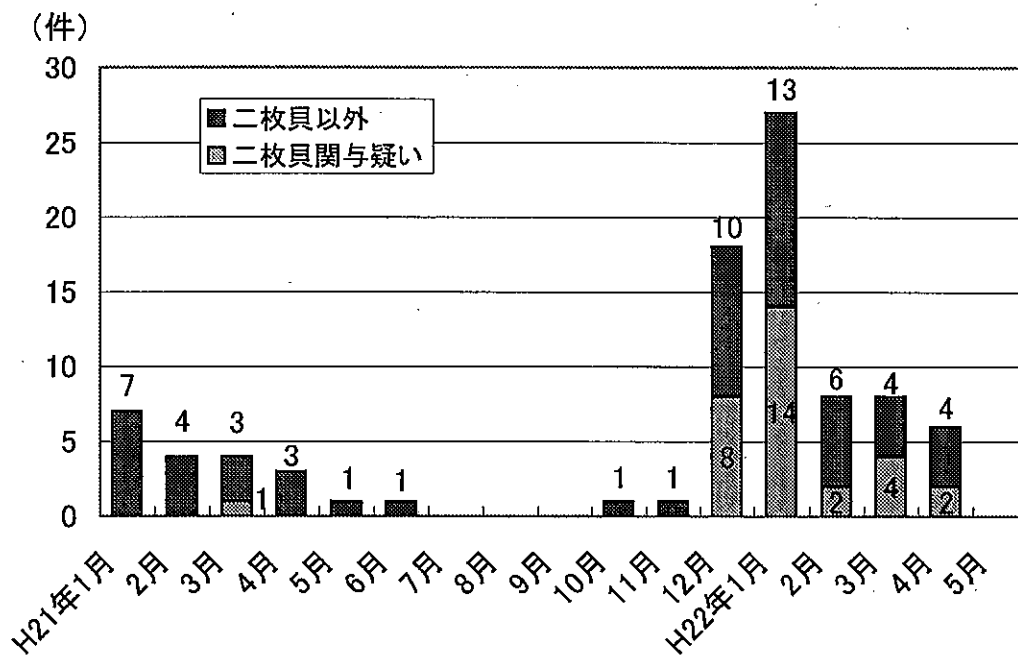
東京都のノロウイルス食中毒事件の発生要因

原因食品別ノロウイルスによる食中毒発生件数年次推移

原因食品	H17	H18	H19	H20	H21	H22
二枚貝関与疑い	12(36.4%)	7(15.9%)	2(7.4%)	7(22.6%)	8(20.5%)	22(44.9%)
その他	21	37	25	24	31	27
総数	33	44	27	31	39	49

※平成22年は5月31日時点での速報値

原因食品別ノロウイルスによる食中毒発生件数月次推移(平成21年1月～平成22年5月)



(東京都食品監視課「東京都食中毒発生状況」をもとに作成)

ノロウイルス失活を目的とした冷凍カキフライの加熱条件の検討について

1 はじめに

東京都内におけるノロウイルスによる食中毒発生件数は、平成 13 年以降、連続して第 1 位を占めている。特に平成 18 年は食中毒発生件数 114 件中 44 件 (38.5%)、患者数 2614 人中 1342 人 (51.3%) がノロウイルスによるものであり、その食中毒予防対策が急務となっている。その原因としては、自然界でノロウイルスに汚染された二枚貝類 (主に生カキ) やノロウイルスに感染した調理従事者を介して汚染された食品が考えられる。

平成 17 年に当所管内で発生したノロウイルスによる食中毒事件の中にも、加熱不足のカキフライを喫食したことが原因であった可能性を示唆するものがあつた。

厚生労働省の「ノロウイルスに関する Q&A」には、ノロウイルスの失活化には、「食品の中心温度 85℃以上で 1 分間以上の加熱 (以下、ノロウイルス失活化の条件という) を行えば、感染性がなくなる」と記載されているが、現状では飲食店営業施設 (スーパーのバックヤード及びそうざい専門店等) で調理従業員が毎回中心温度を測り、安全性を確認することは難しい状況にある。

そこで、当所では未加熱の冷凍カキフライ (以下、冷凍カキフライという) を調理する際における、ノロウイルス失活化の目安となる条件設定のための実験を行った。

2 調査方法

(1) 冷凍カキフライ中のノロウイルスによる汚染実態調査

ア 調査期間

平成 17 年 9 月から平成 19 年 2 月まで

イ 調査検体

- i 管内のスーパーで販売されている冷凍カキフライ
- ii 管内の飲食店営業施設で調理・販売している原料の冷凍カキフライ

ウ 検査件数

80 検体 (ロット別、メーカー別)

エ 検査内容

ノロウイルス検査

オ 検査機関

東京都健康安全研究センター多摩支所微生物研究科衛生細菌研究室

(2) 飲食店営業施設における冷凍カキフライの加熱実態調査

ア 調査期間

平成 17 年 9 月から平成 18 年 2 月まで

イ 調査施設

管内のカキフライを調理・販売している飲食店営業施設 11 施設

ウ 調査項目

- i 当該施設マニュアルの加熱条件（フライヤー設定温度、加熱時間）
- ii 実際 of 加熱条件（油温、加熱時間）
- iii 中心温度

(3) 冷凍カキフライの加熱条件設定に関する調査

ア 調査期間

平成 18 年 10 月から平成 19 年 2 月まで

イ 調査施設

管内のカキフライを調理・販売している飲食店営業施設（スーパーのバックヤード）1 施設

ウ 調査方法

i カキフライの中心温度測定

業務用フライヤーを用い、冷凍カキフライの加熱実験を行った。冷凍カキフライを加熱後、カキフライ固定具（当所職員開発）を用い、中心温度測定用データロガーを使用して、1 回の実験につき、カキフライ 1 個の中心温度を測定した。冷凍カキフライ並（1 個の平均重量：23.75g）及び特大（1 個の平均重量：30g）を使用した。油量は約 16 リットルとした。

ii 油温測定

加熱中の油温の変化についても同時に測定した。

iii 商品性の判断（色・食味）

当該施設の調理従事者による食味試験で、商品性の判断を行った。

エ 加熱条件（表 2 参照）

i 加熱時間：4～7 分間

ii フライヤー設定温度：160～180℃

参考として、冷凍カキフライ特大（20 個入）を 20 個投入。

<当該施設マニュアルの加熱条件>

フライヤー設定温度：170℃

冷凍カキフライ並（20 個入）40 個投入

加熱時間：5 分間

(4) 当所検査室における補足実験

(3) の実験に使用した冷凍カキフライ並 200 個について、それぞれの重量を測定後、そのうち任意の 20 個について、フライヤー設定温度を 170℃にした場合と同様になるような油温条件で 5 分 30 秒の加熱実験を行い、それぞれのカキフライの中心温度を測定した。実験対象とした冷凍カキフライ 20 個の内訳は、20g 以上 23g 未満 8 個、23g 以上 26g 未満 8 個、26g 以上 4 個である。

3 調査結果

(1) 冷凍カキフライ中のノロウイルスによる汚染実態調査

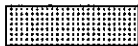
調査対象とした 80 検体の原産地は広島県 24 検体、中国 15 検体、韓国 6 検体、無表示 35 検体で、いずれの検体からもノロウイルスは検出されなかった。

(2) 飲食店営業施設における冷凍カキフライの加熱実態調査

調査結果は表 1 の通りである。11 施設のうち、10 施設にフライヤー設定温度と加熱時間を定めたマニュアルがあった。そのうちノロウイルス失活化の条件を満たしたのは 6 施設であった。

表1 各飲食店営業施設における冷凍カキフライの加熱条件等調査結果

	マニュアルの加熱条件			実際の加熱条件及び中心温度			
	設定温度(°C)	加熱時間	投入個数	油温(°C)	加熱時間	中心温度(°C)	85°C以上であった時間
1	180	4分~4分30秒	10	179	5分14秒	96.6	3分30秒
2	170	4分30秒~5分	20	165	5分4秒	86.1	11分
3	170	4分	40	167.4	4分11秒	91.4	3分45秒
4	170	4分30秒	10	171	4分48秒	82.3	なし
5	マニュアルなし	マニュアルなし	マニュアルなし	168.5	7分	98.8	4分
6	170	5分	15	169	5分9秒	84.3	なし
7	180	4分	40	164	5分	84.1	なし
8	175	4分~4分30秒	40	173	4分43秒	87.9	1分30秒
9	170	5分	20	171	5分10秒	76.9	なし
10	175	5分	11	175	5分	96.3	3分45秒
11	180	1分30秒	1	177	1分36秒	81.1	なし



はノロウイルス失活化の条件を満たした施設

* 11のみチルド製品

(3) 冷凍カキフライの加熱条件設定に関する調査

実験結果及び油温の実測値はそれぞれ表2、図1の通りである。

ア 当該施設マニュアルの加熱条件では、3回中1回のみノロウイルス失活化の条件を満たした。また5分30秒の加熱では、3回中2回であった。なお、6分加熱した場合は、3回中3回であった。

イ 6分間加熱での商品性は、5分間加熱に比べて低下し、パサつき気味だった。

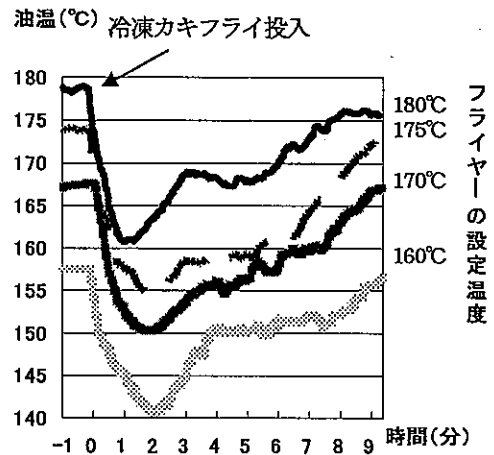


表2 冷凍カキフライの加熱実験結果 (施設における加熱実験)

図1 カキフライ加熱中のフライヤーの油温

	調理方法				実験結果				
	重量	投入個数	設定温度(°C)	加熱時間	実験回数	85°C, 1分以上の回数	内部の様子	商品性(色)	商品性(食味)
1	並	40	160	5分	1	0	水っぽい	薄い	△
2				6分	1	0	問題なし	薄い	△
3			170	4分	3	0	水っぽい	薄い	◎ (ジューズ)
4				5分	3	1	問題なし	良	○
5				5分30秒	3	2	問題なし	良	△
6			175	6分	3	3	問題なし	良	△
7				7分	3	3	空洞多い	濃い	× (加熱)
8				5分	1	1	問題なし	良	△
9				6分	1	1	空洞あり	良	△
10				180	5分	1	0	問題なし	良
11	6分	1	1		空洞あり	濃い	△		
12	特大	20	170	6分	2	1	問題なし	良	△
13				7分	2	2	問題なし	濃い	△



: 実験した回数のすべてでノロウイルス失活化の条件を満たしたもの ④: 当該施設マニュアルの加熱条件

(4) 当所検査室における補足実験

- ア 冷凍カキフライ並 (平均 23.75g) 200 個の重量の実測値は図 2 の通りであった。平均 23.4g±1.75、最小 19.1g、最大 29.1g。
- イ 加熱実験を行った 20 個のうち、ノロウイルス失活化の条件を満たさなかったのは 2 個のみであり、重量はいずれも 26g 以上であった。(図 3)

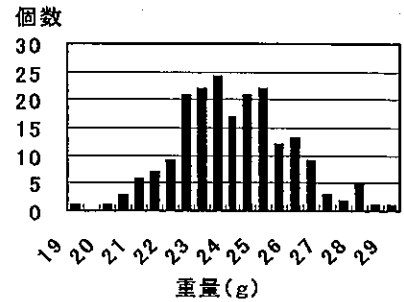


図 2 冷凍カキフライ並の 1 個当たりの重量 (g)

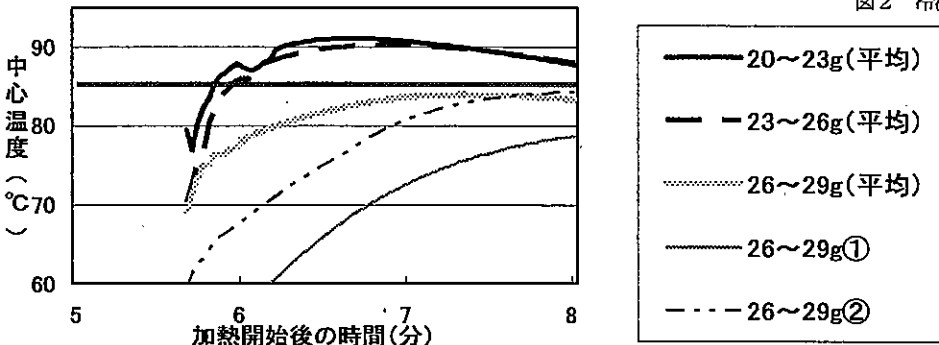


図 3 冷凍カキフライの重量別の中心温度

4 考察及びまとめ

今回の汚染実態調査では、検査した冷凍カキフライからはノロウイルスは検出されなかった。しかし、東京都市場衛生検査所が平成 15 年度から 17 年度までに行ったノロウイルスの検査では、加熱用カキの約 8 割、生食用カキの約 3 割からノロウイルスが検出されたとの報告があり、冷凍カキフライが安全であると断定することはできない。

また、冷凍カキフライの加熱実態調査においては、ノロウイルス失活化の条件を満たさなかったのは 11 施設中 5 施設であり、カキフライ加熱不足の施設が半数近くあることが判明したため、今後は十分な加熱を行うよう指導を行った。

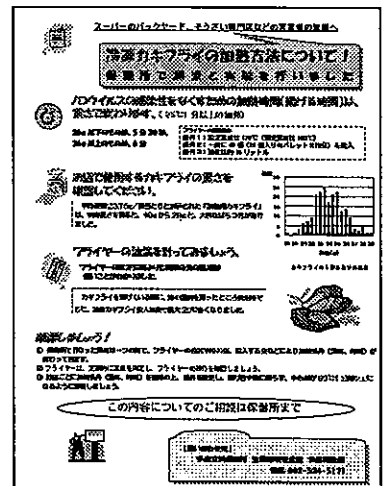
冷凍カキフライの加熱条件設定に関する調査結果からは、当該施設マニュアルの加熱条件である油温 170℃、5 分間加熱では、ノロウイルス失活化には不十分で、6 分間以上の加熱が必要であることがわかった。

また当所検査室における補足実験では、ノロウイルス失活化の条件を満たさなかったのは 26g 以上の 2 個であったことから、中心温度のばらつきの一因として冷凍カキフライの重量が影響していると推測された。

従って、冷凍カキフライ 1 個当たりの重量を均一化できれば、5 分 30 秒の加熱でもノロウイルスを失活化できると考えられる。

今回の調査に協力した営業者に対し、調査結果等の指導を行ったところ、冷凍カキフライの単価は多少上がるが、1 個当たりの重量を均一化することは可能であるとのことである。

今回の結果を元に営業者向けに冷凍カキフライの調理の際の注意事項等をまとめたチラシを作成した。当所 HP にも掲載中である。カキによる食中毒防止を徹底するため、スーパーのバックヤード等の飲食店営業施設を中心に配布を行い、指導中である。



ノート

細菌添加培養処理によるカキなどからの
ノロウイルス検出率の向上

(平成20年3月3日受理)

秋場哲哉*¹ 田中達也² 新井輝義¹ 林志直¹ 森 功次¹
野口やよい¹ 永野美由紀¹ 吉田靖子¹ 矢野一好¹Enhancement of Norovirus Detection Rates in Oysters and
Other Food Samples by Using Bacterial TreatmentTetsuya AKIBA*¹, Tatsuya TANAKA², Teruyoshi ARAI¹, Yukinao HAYASHI¹, Kohji MORI¹,
Yayoi NOGUCHI¹, Miyuki NAGANO¹, Yasuko YOSHIDA¹ and Kazuyoshi YANO¹¹Department of Microbiology, Tokyo Metropolitan Institute of Public Health:
3-24-1 Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan;²Graduate School of Marine Science & Technology, Tokai University: 3-20-1 Orido,
Shimizu-ku, Shizuoka 424-8610, Japan; * Corresponding author

Factors such as low recovery rate and food contaminants may be responsible for the difficulty of detecting Norovirus (NV) by PCR in foodborne outbreaks. To detect NV more efficiently, we introduced a bacterial treatment, in which concentrated samples were incubated overnight with *Klebsiella oxytoca* at 35°C before RNA extraction using the standard protocol. Recovery rates of NVs (G I/8 or G II/13) added to food suspensions in the modified method were compared with those in the standard method by quantification of NV RNAs using real-time PCR. Recovery rates in the modified method were 8.6% for G I/8 and 11.6% for G II/13 in 18 oyster samples and 13.9% for G I/8 and 19.6% for G II/13 in 15 other food samples, while those in the standard method were 0.3% for G I/8 and 0.5% for G II/13 in the oyster samples and 1.9% for G I/8 and 7.9% for G II/13 in the other food samples. These results indicate that the bacterial treatment increase the recovery of NV from foods such as oysters, suggesting that the modified method will be useful for NV detection in food samples.

(Received March 3, 2008)

Key words: ノロウイルス Norovirus; 食品 food sample; 細菌 bacteria; 回収率 recovery rate

緒 言

食品からのノロウイルス (NV) 検出は、食中毒原因物質の特定および感染経路の究明を行い、新たな感染の拡大や発生を未然に防止する上で重要な検査である。しかし、実際に食品から NV が検出される事例は非常に少なく、東京都では2006年に1,108件の食中毒関連食品の検査を行ったが、NVは全く検出されなかった。これは食品成分由来の夾雑物が検査に影響することや、食品中に含まれる微量な NV を効率よく回収することが難しいためと考えられる。NV の検出は平成15年11月5日付けの厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知、食安監発第

1105001号*¹)に記載された方法(以下、通知法とする)により実施されているが、その後もカキなどからの検出感度を高めるための検討が行われている^{1),2)}。筆者らは食品由来夾雑物の除去法に焦点を絞って検討を行い、細菌を利用してカキやその他の食品中に含まれる食品由来夾雑物を分解あるいは消化させる前処理法を考案した。今回 NV 添加回収実験において回収率が向上する結果を得たので、以下にその概要を報告する。

材料および方法

1. 供試食品

2007年10月から12月に東京都内で市販された生食用マガキ18検体、同時期に東京都内で市販または調理され

* 連絡先

¹ 東京都健康安全研究センター微生物部: 〒169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

² 東海大学大学院海洋学研究所: 〒424-8610 静岡県清水区折戸3-20-1

*¹) 厚生労働省ホームページ: ノロウイルスの検査法について
<http://www.mhlw.go.jp/topics/syokucyu/kanren/kanshi/031105-1.html>

た食品 15 検体を用いた。カキは 1 検体につき 2~4 個体から取り出した中腸腺に PBS (-) (pH 7.4: 日水製薬) を加えてホモジナイズし 10% 乳剤を作製した^{2), 4)}。他の食品は 4~5 g を秤量後、5~10 倍量の PBS (-) を加えたフィルター付き細菌検査用ポリ袋中で 1 分間ストマッカー処理を行った。

2. 供試材料の作製

過去に東京都健康安全研究センターで食中毒患者の糞便から検出され、Kageyama らの方法⁵⁾により遺伝子型を決定した NV 遺伝子型 G I/8 株 (以下、G I/8 とする)、G II/13 株 (以下、G II/13 とする) を添加用 NV とした。それぞれの NV が検出された糞便乳剤を PBS (-) で 1,000 倍に希釈後等量混合し、孔径 0.22 μm のフィルターでろ過して添加用ウイルス浮遊液を作製した。この添加用ウイルス浮遊液 140 μL を各食品乳剤 6 mL に添加したものを供試材料、PBS (-) 6 mL に添加したものを対照材料とした。

3. 前処理用菌浮遊液の作製

東京都健康安全研究センターにおいて、食品から分離同定された *Klebsiella oxytoca* を 35°C、20 時間培養した普通斜面培地から、PBS (-) を用いて McFarland 4 (1.2 \times 10⁹/mL) の菌浮遊液を作製した。

4. 通知法による前処理

通知法に従い、供試材料および対照材料を 4°C、10,000 rpm、20 分間遠心後、上清を 30% ショ糖溶液 1 mL に重層し、40,000 rpm、2 時間 (HITACHI himac CP80 WX) 超遠心した (以下、標準法とする)。得られた沈渣を滅菌蒸留水 140 μL で再浮遊し、全量を RNA 抽出に用いた。

5. 細菌を用いた前処理

供試材料および対照材料に、上記の前処理用菌浮遊液 10 μL を添加後 35°C で一晚培養した。培養後の材料は標準法と同様に遠心処理した (以下、A3T 法とする) 後、沈渣を滅菌蒸留水 140 μL で再浮遊した全量を RNA 抽出に用いた。

6. NV 検出方法

RNA 抽出、DNase 処理、cDNA 合成およびリアルタイム PCR による NV の検出は、通知法に準拠して行った。RNA の抽出は QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用い、DNase 処理には DNase I (TaKaRa) を用いた。逆転写酵素は MMLV (in vitro gen), プライマーは Random hexamer (Amersham Biosciences) を用いた。合成した cDNA 5 μL を鋳型として、ABI PRISM 7900 (Applied Biosystems) によるリアルタイム PCR を行い、添加した NV を検出、定量した。プライマーおよびプローブは G I 検出用に COG1F/COG1R, RING1-TP (a), G II 用として COG2F/COG2R, RING2-TP を用い、50°C 2 分、95°C 10 分を 1 回、95°C 15 秒、56°C 1 分を 45 回繰り返した。

7. 定量用標準曲線

国立感染症研究所より分与された NV コントロール DNA を 10 段階希釈した標準液を作製し、各濃度の標準液より得られたリアルタイム PCR の threshold cycle (Ct 値) から定量用標準曲線を作製した。

結 果

標準法および A3T 法による前処理後に得られたリアルタイム PCR の Ct 値、Ct 値と定量用標準曲線から求めたウイルス RNA コピー数を Table 1 に示した。標準法では 29 検体中 G I/8 で 4 検体、G II/13 で 1 検体が NV 不検出となった。検出できなかった検体はいずれもカキであった。NV 不検出の検体を除いて Ct 値を比較した場合、A3T 法は標準法に比べ、カキでは G I/8 で 2.9~10.5 (平均 6.8) サイクル、G II/13 で 2.6~8.8 (平均 6.4) サイクルの短縮が見られた。得られた Ct 値を用いて t 検定を行った結果、両前処理法には $p < 0.001$ (両側) で有意差が認められた。他の食品においても G I/8 で 0.5~6.7 (平均 3.4) サイクル、G II/13 で 0~4.4 (平均 1.9) サイクル Ct 値は短縮 ($p = 0.002$) したが、対照材料では有意差は見られなかった ($p = 0.796$)。

添加用ウイルス浮遊液 140 μL を直接 RNA 抽出した場合の Ct 値は G I/8 が 28.6 サイクル、G II/13 が 25.1 サイクルであり、この NV RNA 定量値は、定量用標準曲線から G I/8 では 201,071 copies/test、G II/13 では 504,045 copies/test と算出された。この濃度を 100% とし、供試材料に添加した NV の回収率 (x) を $x = (\text{供試材料中の NV 定量値} / \text{添加用ウイルス浮遊液中の NV 定量値}) \times 100$ により求めた (Fig. 1)。標準法の回収率の平均は、カキでは G I/8 で 0.3%、G II/13 で 0.5%、他の食品では G I/8 で 1.9%、G II/13 で 7.9% であった。これに対し A3T 法の回収率の平均は、カキでは G I/8 で 8.6%、G II/13 で 11.6%、他の食品では G I/8 で 13.9%、G II/13 で 19.6% であった。標準法による対照材料の回収率は G I/8 で 21.9%、G II/13 で 31.2% であった。なお、菌浮遊液のみから核酸抽出し、DNase 処理を行わずにリアルタイム PCR で検査した結果、添加した *K. oxytoca* の DNA によると思われる偽陽性反応は見られなかった。また、カキ乳剤を用いた事前実験で、菌浮遊液を添加せずに 35°C で一晚培養した場合の NV 回収率は、標準法との間に大きな差は認められなかった。

考 察

今回筆者は、食品からの NV 検出率の改善を目的に細菌を利用した前処理 A3T 法を試み、一定の効果が認められる結果を得た。これまでの遠心分離による方法では、遠心濃縮後の沈渣、沈澱物中に残存する食品由来夾雑物の除去が不十分であり、その後の核酸抽出から PCR 反応に至る過程に影響を与えたと考えられた。A3T 法は、遠心濃縮前に細菌を添加し培養処理を行うことで食品由来夾雑物

Table 1. Threshold cycles and NV RNA copies (/test) of standard method and modified method with bacterial treatment

Samples	G I/8					G II/13				
	Standard		A3T			Standard		A3T		
	Ct	Copies	Ct	Copies	Ratio	Ct	Copies	Ct	Copies	Ratio
Oyster 1	ud	0	33.8	9,259	(-)*	ud	0	29.6	49,632	(-)
Oyster 2	41.2	116	34.7	5,435	(46.9)	35.9	1,934	30.4	32,869	(17.0)
Oyster 3	37.7	921	34.8	5,123	(5.6)	33.8	5,704	31.0	24,130	(4.2)
Oyster 4	ud	0	34.3	6,887	(-)	37.8	727	30.3	34,607	(47.6)
Oyster 5	ud	0	33.1	14,013	(-)	36.6	1,348	28.8	74,943	(55.6)
Oyster 6	44.4	17	33.9	8,727	(513.4)	37.8	727	29.4	55,018	(75.7)
Oyster 7	ud	0	36.4	1,987	(-)	39.0	392	30.9	25,406	(64.8)
Oyster 8	42.5	54	34.4	6,492	(120.2)	36.3	1,574	29.0	67,606	(43.0)
Oyster 9	40.6	165	36.9	1,478	(9.0)	35.8	2,036	31.3	20,675	(10.2)
Oyster 10	42.9	42	33.6	10,423	(248.2)	36.5	1,420	29.9	42,525	(29.9)
Oyster 11	40.5	176	34.9	4,828	(27.4)	33.9	5,417	31.3	20,675	(3.8)
Oyster 12	41.4	103	32.6	18,839	(182.9)	37.9	690	29.1	64,212	(93.1)
Oyster 13	41.2	116	32.2	23,872	(205.8)	35.9	1,934	29.6	49,632	(25.7)
Oyster 14	40.7	156	30.8	54,676	(350.5)	36.4	1,495	27.6	139,055	(93.0)
Oyster 15	34.8	5,123	30.6	61,547	(12.0)	32.1	13,692	27.9	119,144	(8.7)
Oyster 16	36.0	2,518	31.0	48,571	(19.3)	33.7	6,005	28.1	107,480	(17.9)
Oyster 17	39.2	379	32.3	22,500	(59.4)	35.9	1,934	28.9	71,180	(36.8)
Oyster 18	41.8	81	34.9	4,828	(59.6)	36.2	1,657	29.3	57,926	(35.0)
Mean	40.4	554	33.6	17,194	(31.1)	36.0	2,705	29.6	58,706	(21.7)
Sashimi	36.8	1,568	33.2	13,208	(8.4)	31.2	21,768	28.2	102,084	(4.7)
Steamed chicken	34.7	5,435	30.6	61,547	(11.3)	29.6	49,632	27.0	189,415	(3.8)
Rice	35.2	4,043	30.7	58,010	(14.3)	29.3	57,926	27.5	146,405	(2.5)
Pear	38.6	540	34.2	7,307	(13.5)	33.3	7,379	31.6	17,715	(2.4)
Tofu	36.9	1,478	32.4	21,207	(14.3)	32.7	10,052	28.3	96,959	(9.6)
Tsukemono	35.7	3,007	34.7	5,435	(1.8)	31.6	17,715	31.6	17,715	(1.0)
Bread	33.1	14,013	31.3	40,669	(2.9)	29.1	64,212	28.5	87,467	(1.4)
Fried chicken	34.0	8,226	31.3	40,669	(4.9)	29.2	60,988	27.6	139,055	(2.3)
Salad	40.8	147	40.3	198	(1.3)	34.5	3,977	32.1	13,692	(3.4)
Cake	35.0	4,551	31.4	38,331	(8.4)	29.4	55,018	26.9	199,428	(3.6)
Stew	40.5	176	33.8	9,259	(52.6)	34.1	4,887	30.7	28,163	(5.8)
Gyoza	35.7	3,007	32.0	26,873	(8.9)	29.3	57,926	27.4	154,145	(2.7)
Scrambled eggs	34.5	6,118	30.9	51,533	(8.4)	28.1	107,480	27.5	146,405	(1.4)
Cookie	35.9	2,671	31.3	40,669	(15.2)	29.2	60,988	27.9	119,144	(2.0)
Hamburger	37.2	1,238	35.5	3,385	(2.7)	32.1	13,692	30.8	26,749	(2.0)
Mean	36.3	3,748	32.9	27,887	(7.4)	30.8	39,576	28.9	98,969	(2.5)
PBS 1	31.2	43,147	30.6	61,547	(1.4)	27.1	179,905	27.0	189,415	(1.1)
PBS 2	30.9	51,533	30.7	58,010	(1.1)	27.3	162,293	27.0	189,415	(1.2)
PBS 3	31.3	40,668	30.1	82,745	(2.0)	27.4	154,145	27.2	170,872	(1.1)
PBS 4	31.3	40,668	30.6	61,547	(1.5)	27.7	132,073	27.6	139,055	(1.1)
Mean	31.2	44,004	30.5	65,962	(1.5)	27.4	157,104	27.2	172,189	(1.1)
Viral fluid	28.6	201,071				25.1	504,045			

ud: undetected

* Ratio of copy numbers in the case of A3T treatment to copy numbers in the case of standard treatment

の分解、消化を図るものである。通知法では、超遠心後の浮遊液に不純物が多いと判断された場合のみ 10,000 rpm, 20 分間遠心処理し、不純物との分離を行うとされている。しかし、この遠心処理は NV 回収率が一定程度向上する場合と逆に低下する場合の両方が見られ、不純物が多いと判断する基準、あるいは行ったほうが良いと判断する基準が明確でない。このことから、今回の検討では標準法、A3T 法とも超遠心後の遠心処理は省略することとした。

Escherichia coli など 10 種の細菌とカキ乳剤を用いた事前実験の結果において、最も高い回収率を示した *K. oxy-*

ytoca を今回の前処理用細菌として用いた。高い回収率を示した理由として、*K. oxytoca* は比較的多くの糖類やアミノ酸類に対して分解能を有しているためと推察された。標準法と比較して A3T 法の有用性が認められなかった食品では、*K. oxytoca* による処理がこれらの食品由来夾雑物には不足、または不適當であったものと考えられた。添加する菌数を 10 倍量あるいは 1/10 量とした場合や、培養時間を 48 時間まで延長した場合の回収率にはほとんど変化は見られなかった。したがって、今後はより分解能の高い細菌や複数種の細菌を添加する、あるいは食品群別に適当

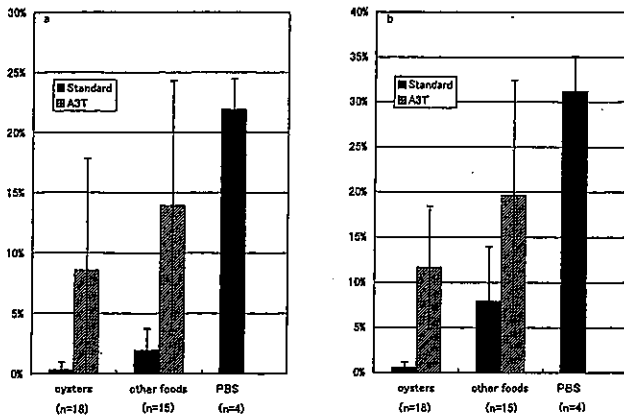


Fig. 1. Recovery of NV from oysters, other foods, and PBS. a: GI/8, b: GII/13. Data indicates % recovery rate with standard deviation

な細菌を選択して使用することなどを検討することで、さらに回収率が高まることに期待する。PCR反応を用いるための夾雑物の除去法として、酵素や化学反応、フィルターを利用した処理方法^{2), 3), 6)}が試みられているが、細菌を用いた方法は特殊な器具や試薬類を必要とせず、添加した細菌とNVを分離することが比較的容易であることから、食品からのNV検出法に1つの方向性を示唆するものであると考えられた。

文 献

1) Noda, M., Nishio, O., Akiyama, M., Kunii, E., Yamamoto, M., Fujii, A., Ikeda, Y., Hirasaki, K., Matsumoto,

M., Ogino, T. Norovirus kensyutsuritsu no oyobosu kaki kensa kosu no eikyou. Hiroshimashi Eiken Nenpo (Annual Report of Hiroshima City Institute of Public Health), 23, 70-73 (2004)

- 2) Noda, M., Nishio, O., Yamamoto, M., Ito, H., Ikeda, Y., Matsumoto, M., Ogino, T. Kongou kaki kentai karano Norovirus nousyukusousa ni okeru amylase syori no yuyousei. Hiroshimashi Eiken Nenpo (Annual Report of Hiroshima City Institute of Public Health), 25, 35-43 (2006)
- 3) Tanaka, T., Akiba, T., Mori, K., Noguchi, Y., Hayashi, Y., Konuma, H., Yoshida, Y., Yamada, S. Comparison and evaluation of methods for RNA extraction of Norovirus from oyster. Jpn. J. Food Microbiol., 24, 157-162 (2007).
- 4) Yamaki, N., Ueki, Y., Suto, A., Sakai, K., Kikuchi, N., Goto, I., Okimura, Y., Akiyama, K., Tohya, Y. Histochemical virus observation in the oyster digestion diverticulum with *in situ* hybridization method. Jpn. J. Food Microbiol., 23, 21-26 (2006).
- 5) Kageyama, T., Shinohara, M., Uchida, K., Fukushi, S., Hoshino, B. F., Kojima, S., Takai, R., Oka, T., Takeda, N., Katayama, K. Coexistence of multiple genotype, including newly indentified genotypes, in outbreaks of gastroenteritis due to norovirus in Japan. Clin. Microbiol., 42, 2988-2995 (2004).
- 6) Queiroz, A. P. S., Santos, F. M., Sassaroli, A., Harsi, C. M., Monezi, T. A., Mehnert, D. U. Electropositive filter membrane as an alternative for the elimination of PCR inhibitors from sewage and water samples. Appl. Environ. Microbiol., 67, 4614-4618 (2001).