

よって新クローンを同定できることを示し、新クローンに関する研究が容易になった (Matsumoto et al. 2000)。1996 年以後にインド、バングラデシュ、ラオス、タイ、台湾、韓国、および日本を含むアジア地域を中心に多数の腸炎ビブリオ感染症例が頻繁に報告されるようになり、1998 年には米国でも同様の状況が確認できた。研究協力者 (西沢) らのグループは、これらの感染症が新クローンによるものであり、このクローンによる世界的大流行 (pandemic) が起こっていることを証明した (Matsumoto et al. 2000)。さらに、新クローンからは O:K 血清型が変化した派生型 (O4:K68 型、O1:KUT 型) も出現し、O3:K6 型と同様の経路で世界的流行をおこしていることも明らかにした (Matsumoto et al. 2000; Chowdhury et al. 2000; Chang et al. 2000)。このクローンが最初に出現した地域を特定し、それが常在する環境中における菌の動態や汚染魚介類の現状、汚染魚介類を介した感染・伝播の様式を明らかにすることは、この菌によって汚染した食品のリスクアセスメントを実施するために極めて重要である。また大量の魚介類を輸入・消費している我が国においては、国際的視点から汚染魚介類の状況を把握する必要がある。

病原微生物検出情報に記載された情報をもとに 2000 年度に我が国の検疫所で確認された腸炎ビブリオ感染者の渡航先を表 1 にまとめた。この表から、世界的にはタイが非常に重要な腸炎ビブリオ感染症発生地域であると推察される。また、研究協力者 (西沢) らのグループは、世界ではじめて新クローンを環境から分離した (Vuddhakul et al. 2000) が、菌の由来はタイ南部のソンクラ地区で市販されていたアカガイであった。そこで研究協力者らは、この地区において腸炎ビブリオ新クローンによる魚介類の腸炎ビブリオ新クローン汚染状況、感染症発生状況、および両者の相関関係を明らかにするための研究を実施した。

表 1. 2000 年 1 月から 12 月の期間中に我が国の検疫所で確認された腸炎ビブリオ感染者の渡航先

渡航先	患者数	渡航先	患者数
タイ	108	台湾	2
ベトナム	41	韓国	2
フィリピン	32	カンボジア	2
中国	17	オーストラリア	2
シンガポール	14	マカオ	2
マレーシア	11	ネパール	1
香港	11	バングラデッシュ	1
インドネシア	9	英国	1
インド	2	その他	2

## 2. 材料及び方法

### 2. 1. 臨床サンプル

タイ南部ソンクラ地区の Songklanagarind 病院および Hat Yai 病院において下痢患者肛門部から綿棒でサンプルを採取し、TCBS 寒天培地に接種した。発育してきた緑青色集落を生化学性状検査に供し、腸炎ビブリオと同定された菌株を凍結保存した。本研究では、これらの菌株について詳細な遺伝学的解析を実施した。

### 2. 2. 魚介類サンプル

ソンクラ地区の生鮮市場で販売されている魚介類を購入し、実験室まで室温で輸送し検査に供した（購入後 60 分以内）。約 25g のサンプルを 225 ml のアルカリペプトン水（pH 8.6）に接種し、37 度で 6-8 時間増菌培養した後、過去に報告したように免疫磁気ビーズ法を用いて特異 K 抗原を保有する菌株を選択的に分離するよう試みた（Vuddhakul et al. 2000）。すなわち増菌培養液 1 ml を 0.02 ml のウサギ抗 K 血清と反応させ、抗ウサギ IgG 抗体でコートした Dynabead で菌と抗血清との反応物を吸着し、これを直接 TCBS 寒天培地に接種した。発育してきた緑青色集落を生化学性状検査に供し、腸炎ビブリオと同定された菌株についてさらに *toxR* 遺伝子を検査することにより同定を確認した（下記）。1 検体あたり最多 5 菌株の腸炎ビブリオについて *tdh* 遺伝子および *trh* 遺伝子の有無を検査した（下記）。いずれかの遺伝子が陽性である場合、GS-PCR 法による検査に供するとともに O:K 血清型を決定した（下記）。

### 2. 3. 菌株の遺伝学的解析

腸炎ビブリオに特異的な *toxR* 遺伝子の塩基配列を標的として同定する PCR 法（Kim et al. 1999）によって、分離菌株が腸炎ビブリオであることを確認した。分離菌株が新クローンに属するか否かは、*toxR* 遺伝子の塩基配列のうち新クローン特異的な塩基を標的とする GS-PCR 法（Matsumoto et al. 2000）によって決定した。分離菌株における *tdh* 遺伝子および *trh* 遺伝子の有無は過去に報告した PCR 法（Tada et al. 1992）を用いて検査した。

### 2. 4. 血清型の決定

分離菌株の血清型は、定法により特異抗血清を用いた凝集試験によって決定した（Suthienkul et al. 1995）。

## 3. 結果

### 3. 1. 臨床サンプルからの新クローンの検出と解析

1999 年 1 月から 12 月まで、ソンクラ地区の 2 つの市中病院で下痢患者から分離し保存していた腸炎ビブリオ菌株を分子遺伝学的角度から詳細に解析した。まず分離した菌株が腸炎ビブリオであることを *toxR* 検出用 PCR 法で検査して確認した。その結果、11474 検体のうち 317 検体から腸炎ビブリオを分離できたことが確認できた。そのうち 242 検体に由来する菌株が新クローン（GS-PCR+、*tdh*+*trh*-）に属していた（表 2）。新クローンに

属する菌株の中では、O3:K6 型が最も多く (80%)、その他に従来知られていた O4:K68 型 (8.4%) および O1:KUT 型 (1.8%) も検出できた。さらにそれまで報告されていなかった血清型 (O1:K25 型[6.9%]、O1:K41 型[0.32%]、O4:K12 型[0.32%]) も発見した。

表 2. ソンクラ地区の 2 つの市中病院で 1999 年 1 月から 12 月までの期間に下痢患者から分離した腸炎ビブリオの遺伝学的性状と血清型

血清型	菌株数				
	GS-PCR+	GS-PCR-			
	<i>tdh+</i> <i>trh-</i>	<i>tdh+</i> <i>trh+</i>	<i>tdh+</i> <i>trh-</i>	<i>tdh-</i> <i>trh+</i>	<i>tdh-</i> <i>trh-</i>
O3:K6	192	0	0	0	0
O4:K68	21	0	6	0	0
O1:KUT	4	2	0	1	1
O1:K25	22	0	0	0	0
O1:K41	1	1	0	0	0
O4:K12	1	0	1	0	0
O3:K(6)*	1	0	0	0	0
その他	0	5	33	3	22
合計	242	8	40	4	23

\*K6 反応が弱い菌株

### 3. 2. 魚介類サンプルからの新クローンの検出と解析

2001 年度の検査結果を 1998-2000 年度の結果と比較できるように表 3 および表 4 にまとめた。2000 年度までは、各種魚介類を広く検査したところ病原性株 (*tdh+*または *trh+*) が貝類のみから分離された (表 3)。そこで 2001 年度は貝類に重点をおいて病原性株の分離を試みた。また 1998-2000 年度の検査では、抗 K6 抗体と抗 K68 抗体の混合物を免疫磁気ビーズ法で使用した。しかし 2000 年度はじめに患者分離菌株の解析結果から新クローンの O:K 抗原の多様性が明らかになった (上記) ので、免疫磁気ビーズ法で抗 K6 抗体と抗 K68 抗体のみならず抗 K12、抗 K25 抗体、および抗 K41 抗体の混合物を使用した。その結果、1998-2000 年度では合計 4 検体から病原性株が分離できたのに対し、2001 年度だけで 7 検体から病原性株が分離できた (表 3)。

1998-2001 年度に分離した病原性株は、1 株 (PSU47) を除いて *tdh* 遺伝子+で GS-PCR+であり、すべて新クローンであると判定された (表 4)。これらはほとんどが O3:K6 血清型に属していた。しかし 2001 年に分離した 1 株は O1:K25 型株であり、患者から分離した新クローンの O:K 血清型分布 (表 2) と高い相関関係が認められた。1998 年にはアカガイ (*Anadara granosa*) からはじめて新クローンを分離したが、その後他の貝類にも

新クローンが分布することを明らかにした。2001年度には、2種の貝（*Perna viridis* および *Meretrix lusoria*）から新クローンを分離した。

表 3. 1998年から2001年までの魚介類からの病原性株（*tdh+*または*trh+*）の分離結果\*

検査期間	検体の種類				
	エビ	カニ	魚類	貝類	合計
1998年12月 - 1999年2月	0/30	0/0	0/30	2/54	2/114
1999年6月 - 9月	0/4	0/2	0/32	0/30	0/68
2000年6月 - 11月	0/16	0/7	0/29	2/52	2/102
2001年4月 - 12月	0/6	0/5	0/9	7/112	7/132
合計	0/56	0/14	0/100	11/246	11/416

\*病原性株陽性検体数/総検体数

表 4. 1998年から2001年までに貝類から分離した病原性株（*tdh+*または*trh+*）の分離時期、由来、血清型およびGS-PCR検査結果

菌株名	分離時期（年-月）	由来*	毒素遺伝子		血清型	GS-PCR 検査結果
			<i>tdh</i>	<i>trh</i>		
PSU46	1998-12	A	+	-	O3:K6	+
PSU47	1999-1	A	-	+	O11:K3	-
PSU166	2000-8	B	+	-	O3:K6	+
PSU228	2000-10	C	+	-	O3:K6	+
PSU358	2001-4	B	+	-	O3:K6	+
PSU359	2001-4	C	+	-	O3:K6	+
PSU360	2001-4	C	+	-	O3:K6	+
PSU434	2001-5	C	+	-	O3:KUT	+
PSU435	2001-5	C	+	-	O3:K6	+
PSU474	2001-8	C	+	-	O3:K6	+
PSU476	2001-8	B	+	-	O1:K25	+

\*A, *Anadara granosa*, B, *Perna viridis*, C, *Meretrix lusoria*.

#### 4. 考察

2000年度までに得た魚介類サンプルの調査結果および臨床サンプル由来菌株の解析結果を参考に検査方法を改良することにより、2001年度には貝類から高頻度（7/112検体、すなわち6.3%の陽性率）で新クローンを検出した。したがって、タイ南部ソクラ地区の海

洋環境中には高頻度で新クローンが分布していると考えられる。

貝から分離した新クローン菌株と臨床サンプルから分離した新クローン菌株の O:K 血清型分布に強い相関関係が見られる (表 2 および表 4) ことは、市販されている新鮮な貝類が現地での感染症の原因食であることを示唆している。この疫学的関連性を確認するために、今後貝類分離株および臨床分離株を各種 DNA フィンガープリント法で比較する予定である。

貝類からのみ病原性株が分離できたのは、フィルターフィーダーである貝類が高濃度に腸炎ビブリオを蓄積しているからであり、病原性株を特異的に保持しているのではないと考えられる。次年度のプロジェクトではこの点を明らかにするために、貝類の収穫時、販売時、および消費時 (調理後) に貝類に含まれる腸炎ビブリオ全体および病原性菌株のみの細胞数を定量的にモニターし、両者の比率および消長を明らかにしたい。

## 5. 文献

- Chang, B., S.-I. Yoshida, H. Miyamoto, M. Ogawa, K. Horikawa, K. Ogata, M. Nishibuchi, H. Taniguchi. 2000. A unique and common restriction fragment pattern of the nucleotide sequences homologous to the genome of Vf33, a filamentous bacteriophage, in pandemic strains of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6, O4:K68, and O1:K untypeable. *FEMS Microbiol. Lett.* 192:231-236.
- Chowdhury, N. R., S. Chakraborty, B. Eampokalap, W. Chaicumpa, M. Chongsa-Nguan, P. Moolasart, R. Mitra, T. Ramamurthy, S. K. Bhattacharya, M. Nishibuchi, Y. Takeda, and G. B. Nair. 2000. Clonal dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* displaying similar DNA fingerprinting to two different serovars (O3:K6 and O4:K68) in Thailand and India. *Epidemiol. Infect.* 125:17-25.
- Kim, Y. B., C. Matsumoto, N. Takahashi, S. Hashimoto, and M. Nishibuchi. 1999. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* at the species level by PCR targeted to the *toxR* gene. *J. Clin. Microbiol.* 37:1173-1177.
- Matsumoto, C., J. Okuda, M. Ishibashi, M. Iwanaga, P. Garg, T. Rammamurthy, H.-C. Wong, A. Depaola, Y. B. Kim, M. J. Albert, and M. Nishibuchi. 2000. Pandemic spread of an O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* and emergence of related strains evidenced by arbitrarily primed PCR and *toxRS* sequence analyses. *J. Clin. Microbiol.* 38:578-585
- Okuda, J., M. Ishibashi, E. Hayakawa, T. Nishino, Y. Takeda, A. Mukhopadhyay, S. Garg, S. K. Bhattacharya, G. B. Nair, and M. Nishibuchi. 1997. Emergence of a unique O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* in Calcutta, India, and isolation of strains from the same clonal group from Southeast Asian travelers arriving in

- Japan. *J. Clin. Microbiol.* 35:3150-3155.
- Suthienkul, O., M. Ishibashi, T. Iida, N. Nettip, S. Supavej, B. Eampokalap, M. Makino, and T. Honda. 1995. Urease production correlates with possession of the *trh* gene in *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated in Thailand. *J. Infect. Dis.* 172:1405-1408.
- Tada, J., T. Ohashi, N. Nishimura, Y. Shirasaki, H. Ozaki, S. Fukushima, J. Takano, M. Nishibuchi, and Y. Takeda. 1992. Detection of the thermostable direct hemolysin gene (*tdh*) and the thermostable direct hemolysin-related hemolysin gene (*trh*) of *Vibrio parahaemolyticus* by polymerase chain reaction. *Mol. Cell. Probes* 6:477-487.
- Vuddhakul, V., A. Chowdhury, V. Laohaprerththisan, P. Pungrasamee, N. Patararungrong, P. Thianmontri, M. Ishibashi, C. Matsumoto, and M. Nishibuchi. 2000. Isolation of *Vibrio parahaemolyticus* strains belonging to a pandemic O3:K6 clone from environmental and clinical sources in Thailand. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2685-2689.

## 6. 付記

1999年度および2000年度の魚介類調査の一部は、日米医学協力研究会の日米医学協力計画アジア地域奨励研究事業によってサポートしていただいたが、2001年度は申請が却下されたので、サポートが得られなかった。

# ノーウオークウイルスのリスク評価に関する研究

研究協力者	国立公衆衛生院	西尾 治
	青森県環境保健センター	三上稔之、石川和子、筒井理華
	宮城県保健環境センター	沖村容子
	埼玉県衛生研究所	篠原美千代
	三重県保健環境研究所	西 香南子
	広島県保健環境センター	福田伸治
	山口県環境保健研究センター	西田知子
分担研究者	国立感染症研究所	武田直和

## 研究要旨

ノーウオークウイルスのリスク評価の基礎データを得る目的で、カキによる食中毒発生原因食品カキ、市販生カキの NV 汚染状況、カキ養殖海域の海水とカキの NV 汚染状況、リアルタイム PCR 法の検討を行なった。原因カキでは半分の事例からカキ 1 個当たり NV200 コピー以上の汚染が認められた。市販生カキでは 15%に 200 コピー/個以上の汚染が明らかとなり、1 月、2 月に NV 汚染されているカキの比率が高く、且つ NV 量も多いことが明らかとなった。海水とカキの汚染では明らかな関連性は見出せなかったが、今後調査方法の検討が必要である。リアルタイム PCR 法は低い価での再現性に問題があり、今後、検出感度を高めると共に、診断基準の作成が必要である。本研究ではリスク評価の基準作成には多くの問題が提示され、今後規模を拡大して行なう必要があると思慮された。

## A. 研究目的

わが国における厚生労働省に届けられた平成 12 年度の食中毒事例は総数 2247 事例で、そのうち細菌によるものは 1783 事例、ウイルスは 247 事例である。原因物質別では最も多いのがサルモネラ属菌 (518 事例)、カンピロバクター (469 事例)、腸炎ビブリオ (422 事

例)の順で、次いでウイルスによるものが 247 事例で、そのうち 245 事例がノーウオークウイルス (NV) であり、ウイルス性ではその殆どが NV によるものである。さらに病因別の患者数では第一がブドウ球菌 (84 事例) で 14,722 人、二番目は NV の 8,080 人で、次いでサルモネラ属菌の 6,090 人であった。さら

に、平成13年度では病因別の患者数ではNVによるものが第一となっていると非公式ながら聞いている。今や、NVによる食中毒事例発生は社会的にも大きな問題となってきた。

NVによる食中毒事例の原因食品として生カキの喫食によることが多く、生カキのウイルス学的な安全性の確保が急務となっている。しかしながら、生カキの販売は細菌学的な基準によってなされており、ウイルス学的な基準は未だ世界的に確立されていない。

そこで、本研究では食品特に生カキのリスク評価を行なうための基礎データを集積することを目的として、

1. 生カキによる食中毒発生事例の原因食材あるいは同一生産地のカキにおけるNVのリアルタイムPCR法による定量、2. 市販生カキにおけるNVの汚染状況の実態、3. 養殖海域のNV汚染状況と養殖カキのNV量、4. リアルタイムPCR法の検討等について研究を行った。

## B. 研究方法

本研究の遂行に当たり、研究方法を統一して行った。方法は以下に示した方法で行なった。

### 1) カキの処理方法

カキは中腸腺を1検体当たり5個あるいは1個を摘出後、5~10倍量リン酸緩衝液(PBS, -)を加えホモジナイズしたものを3,000rpm、30分間冷却遠心したのち、その上清を35,000rpm、3時間超遠心あるいは24%PEG+1.5M NaClを加え、4°Cで30分間以上静置した後、

12,000rpm、30分間遠心を行い、その沈査をEagles' MEM 500 $\mu$ lで浮遊させたものをRNA抽出に用いた。

### 2) RNAの抽出

RNAはQIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)を用いて抽出し、DNase Iで37°C 30分反応させDNAを分解後、Super Script RT II (Invitrogen)で42°C 1時間反応させcDNAを作製した。

### 3) RT-PCR法

作製したcDNAはcapsid領域を標的とするgenotype 1 (G1)-SK系 (1st:COG1F/G1-SKR, nested:G1-SKF/R)、genotype 2 (G2)-SK系 (1st:COG2F/G2-SKR, nested:G2-SKF/R)、COG1系 (1st:COG1F/G1-SKR, nested:COG1F/R)、COG2系 (1st:COG2F/G2-SKR, nested:COG2F/R)、Ex Taq polymerase (TaKaRa)を用いてPCRを行った。PCR産物は1.5~3% agarose gelで電気泳動を行い、ethidium bromideで染色し判定を行った。

### 4) NV 検出・定量のリアルタイム PCR 法

NV 検出・定量のリアルタイム PCR 法は前述のように作製したcDNAを4

$\mu$ l用いて景山らの方法で行なった。すなわち、G1ではプライマーCOG1FとCOG1Rを、G2ではプライマーCOG2FとCOG2Rを、蛍光標識したプローブはG1ではRING1-TP(a):5'-AGA TYG CGA TCY CCT GTC CA-3'とRING1-TP(b):5'-AGA TCG CGG TCT CCT GTC CA-3'の2つを、G2ではRING2-TP:5'-TGG GAG GGC GAT CGC AAT CT-3'を用いた。

## 5) 海水の濃縮法

### (1) 陽電荷膜による濃縮法

陽電化膜法では海水20lをpH5~6に調整後、陽電荷フィルター(0.45mm)で濾過した。フィルターはアルカリ溶液(3%Beef extract:1%NaCl;15%NaNO<sub>3</sub>;pH9.0)に浸し、4°C1時間放置後アルカリ溶液を回収した。3,000rpm,20分遠心後上清に16%PEG/0.8M NaClを等量加え、4°Cで一晩放置した。3,000rpm,30分遠心後、上清を廃棄し、沈渣をEagles' MEM 500mLで再浮遊しRNAの抽出に使用した。

### (2) 陰電荷膜による濃縮法

海水20Lを陰電荷膜孔径5 $\mu$ mの下に孔径0.45 $\mu$ mの膜を重層したものに通し、次いで、 $1.0 \times 10^{-3}$  N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(pH3) 1.8L(900ml/minの流速で)を膜に通した。その後 $1.0 \times 10^{-3}$  N NaOH(pH10.5) 45mlを膜に注ぎ、5分間置いた後、これを試験管に回収した。次いで、回収液を35,000rpm、3h超遠心し、その沈渣をEagles' MEM 500 $\mu$ lで浮遊させたものをRNA抽出に用いた。

## 6. 遺伝子配列の決定

遺伝子配列の決定はPCR産物を用い、ダイターミネーター法で行なった。

## 1. カキによる食中毒発生例の原因食材あるいは同一生産地のカキにおけるNVのリアルタイムPCRによる定量成績

### A) 研究目的

カキ関連食中毒 14 事例における原

因となったカキあるいは同一海域のカキ 30 件についてリアルタイム PCR 法により、カキに含まれている NV 量を行い、発病とウイルス量の関連を明らかにし、リスク評価の基礎データを得ることを目的としている。

### B) 研究方法

前述の方法で行った。

### C) 研究成績

カキの喫食による食中毒 14 事例(疑いを含む)における原因食品のカキに蓄積されている NV 量をリアルタイム PCR 法で定量的に検出した(表 1)。

14 事例のうちリアルタイム PCR 法でカキ 1 個 当たり NV が 200 コピー以上検出されたのは 7 事例で、3 事例の NV コピー数は 10 から 90 コピーで、4 事例はリアルタイム PCR で測定値以下であった。

各カキのリアルタイム PCR と RT-PCR との結果では(表 2)、リアルタイム PCR(+)でカキ 1 個あたり 200 コピー以上では RT-PCR(+)が 6 件、RT-PCR(-)が 5 件、リアルタイム PCR で 1-199 コピーは RT-PCR(+)は 3 件、RT-PCR(-)は 1 件で、リアルタイム PCR 法では 0 コピーで RT-PCR(+)が 4 件、RT-PCR(-)が 5 件であった、リアルタイム PCR のコピー数と RT-PCR との間にはコピー数が少なくなると PCR の陰性が多くなる傾向が見られた。

### D) 考察およびまとめ

原因食材とリアルタイム PCR によるコピー数ではカキ 1 個当たりの NV のコピー数は 0 から 3,300 まで認められた。

一般に NV は 10 個から 100 個で発病すると言われておりリアルタイム PCR で陽性のものは発病させるウイルス量が含まれていたことになる。しかしながら、本実験方法はリアルタイム PCR で検査による 1 コピーはカキ 1 個当りに換算すると 13.5 コピーに相当する。またリアルタイム PCR で陽性と判断されるコピー数は 135/個以上の時である。この点を考慮すると 200 コピー/個以上の時に陽性と判断されると考えられた。しかしリアルタイム PCR で 0 コピーのものでも RT-PCR 法で陽性も認められた。このことからカキからの NV の検出についてリアルタイム PCR 法

と RT-PCR 法は必ずしも一致しなかったため、この要因をさらに追求し明らかにしなければならないと考えている。

今後さらに例数を増し、リアルタイム PCR 法の感度を上げると共に、診断およびリスク評価の基準の作成が不可欠である。

また本研究遂行上の問題点は、カキによる食中毒事例の原因食材が多く的事例で残っていないために検査が行えなかったことである。今後食中毒事例の原因食材を確保することが本研究を遂行するに最も重要なキポイントである。

表 1. 集団発生事例原因カキの NV 検査成績

事例	発生日	原因食材	リアルタイム PCR(x100)			PCR
			G1	G2	G1+G2	
1	01/17/02	食中毒 事例1:三陸産カキ	0	0.1	0.1	-
2	10/19/02	食中毒 事例2:広島産カキ	0	0	0	-
		食中毒 事例2:広島産カキ	0	0	0	-
		食中毒 事例2:広島産カキ	0	0	0	+
		食中毒 事例2:広島産カキ	0	0	0	+
		食中毒 事例2:広島産カキ	0	0	0	-
3	01/16/00	食中毒原因カキ	0.7	7	8	+
		食中毒原因カキ	3	30	33	+
4	02/04/01	食中毒原因カキと同産地(2個)	0	0	0	+
		食中毒原因カキと同産地(2個)	0	2	2	+
		食中毒原因カキと同産地(2個)	0	0	0	-
5	12/06/01	カキ (原因食品)	0	23	23	-
6	12/06/01	集団発生:カキ (原因食品)	0	5	5	-
		集団発生:カキ (原因食品)	0	8	8	+
		集団発生:カキ (原因食品)	0	5	5	-
7	12/17/01	集団発生:カキ (原因食品)	3	9	12	-
		集団発生:カキ (原因食品)	0	23	23	+
		集団発生:カキ (原因食品)	0	16	16	-
8	12/17/02	宮城県産カキ	0.2	0	0.2	+
9	12/15/02	宮城県産カキ	0	0.9	0.9	+
		宮城県産カキ	0.4	0	0.4	+
10	12/20/01	加熱用カキ	0	3	3	+
11	1/15/02	食中毒事例:カキ	0	0	0	+
12	1//02	食中毒事例:カキ	0	0	0	-
13	2//02	食中毒事例:カキ (加熱用)	0.8	3	4	NT
			0	3	3	NT
			0.4	59	60	NT
			0	13	13	NT
14	2//02	食中毒事例:カキ	0	0	0	NT
			0	0	0	NT

表 2. リアルタイム PCR と RT-PCR 法の比較

リアルタイム PCR \ RT-PCR	+	-	計
200 以上*	6	5	11
1 - 199	3	1	4
0	4	5	9
計	13	11	24

\* : リアルタイム PCR 法によるカキ 1 個当たりの NV コピー数

## 2. 市販生カキにおける NV の汚染状況の実態

### A) 研究目的

市販生カキの NV 汚染実態を把握することを目的として、全国各地で市販されている生カキについて調査研究を行なった。

### B) 研究方法

全国各地で市販されている生カキ 204 件を買い上げ、ロット毎に 5 個の中腸腺を 1 検体としてリアルタイム PCR 法で定量的に NV の汚染状況を調べた。なお、検査方法は全て統一して前述の方法で行なった。

### C) 研究結果

生カキ 204 件のうちリアルタイム PCR で、カキ 1 個当たりのコピー数は 0 個から 4,600 個まで見られた。コピー数 10 以上は 204 件中 62 件 (30%) に認められ 1 個当たりのコピー数が 200 以上は 31 件 (15%) 見出された。

月別では 10 月～12 月の間は検出率が低く、かつ 1 個当たりのコピー数も少数であった。1 月から 3 月の間では NV

に汚染されているカキの率が高くなると共に、汚染されている NV 量も多くなっている。またこの期間では 1 個当たりのコピー数が 1,000 以上のものも見られた。

### D) 考察およびまとめ

全国で市販されている生カキについて、このように大規模に検査法を統一して行い、かつリアルタイム PCR で NV の定量を行なったのはこの研究班の仕事が初めてである。

生カキの NV 汚染は 10 月の販売開始される時期のものでも見られたが、12 月頃までは NV の汚染率が低く、カキに含まれているウイルス量ともに少なかった。しかし 1 月から 3 月の間では汚染率が高くなるとともにカキに含まれるウイルス量も多くなった。わが国では生カキによる食中毒様胃腸炎の集団発生事例は 1 月から 3 月に多発しており、生カキの汚染と事例発生状況は良く一致していた。

以上の成績からカキの汚染実態はカキ喫食による集団発生との関連性が強く示唆され、今後、カキの NV 汚染防止

策の確立とカキの NV 汚染のリスク ことが急務である。  
 評価を正確に行い、感染防止を立てる

表 3. 市販生カキの月別 NV 汚染状況 (カキ 1 個当たりのコピー数 X100)

月	検体数	陽性数(%)	リアルタイム PCR (×100 コピー/ 個)		G1+G2
			G1	G2	
10	3	1 (33.3)	0.2	—	—
11	44	5 (11.4)	0.1	0.3, 0.6, 0.8	0.3
12	42	7 (16.7)	0.3, 0.6, 2	0.3, 0.4, 0.6	2
1	48	18 (37.5)	0.2, 0.4, 1, 9	0.1, 0.6, 0.6, 0.7, 0.7, 1.5, 2, 4, 6, 46	3, 6, 2, 12
2	49	19 (38.8)	0.4, 0.6, 0.9, 5 13	0.2, 0.4, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8, 2, 5	3, 3, 4, 4, 13, 16
3	18	12 (66.7)	0.3, 0.6, 0.8, 2, 2, 10,	2	0.5, 0.7, 2, 4, 14
計	204	62 (30.4)	20(9.8)	25(12.3)	17(8.3)

### 3. 養殖海域の NV 汚染状況と養殖カキの NV 量

#### A) 研究目的

カキ養殖海域における海水の NV 量とそこで養殖されているカキの NV 汚染との関連性を明らかにすることを目的とした。

#### B) 研究方法

3つの湾で、8海域を定点として、原則として月 1 回から 2 回、その海域の海水とそこで養殖されているカキ 200 件について NV 量をリアルタイム PCR 法で調査研究を実施した。

A と C 海域ではその海域で養殖され

ているカキ 5 個を各 1 件、B 海域では 10 個を各 1 件、H 海域では 5 個を 1 件として、計 200 件についてリアルタイム PCR 法で NV の定量を行なった。海水の濃縮は陽電荷膜を用いて行なったが、A、B、C の海域では 2 月のみ陰電荷膜を用いた。

#### C) 研究成績

##### 1) A 海域

海水からは平成 13 年 10 月から平成 14 年 2 月 25 日まで全て NV は検出されなかった。この海域で養殖されているカキのうち平成 13 年 10 月、11 月および平成 14 年 2 月に採取した 5 個は全てリアルタイム PCR および PCR で NV は検

出されなかった。しかし平成13年12月1日ではカキ5個中3個がNV陽性、全てG1で、PCR法では2個が陽性で、G1およびG2が各1個であった。平成14年1月15日では5個中3個(全てリアルタイムPCRのG2が陽性で、1,100~4,800コピーと高い数値であったものの、2個からは検出されなかった。

#### 2) B海域

B海域の海水からNVは見出されなかった。しかし、12月は10個のカキのうち6個から、1月15日は8個からNVが検出され、12月1日はG1の4個の汚染数が1,000~29,600コピーと多く、G2が検出された2個は共に400コピーであった。1月15日ではG1とG2の両方が検出され、4個のコピー数はいずれも3,100以上であった。しかし2個はリアルタイムPCRで陰性であった。PCR法では6個が陽性であった。

1月28日は3個、2月4日は5個、2月12日および2月18日は1個からリアルタイムPCRでNVが検出され、いずれも900以下のコピー数であった。

#### 3) C海域

C海域では検査期間中すべてリアルタイムPCRおよびPCRでNVの汚染は認められなかった。13年10月9日および11月1日に採取した5個の全てが陰

性であった。12月1日はG1が2個、G2が1個から、1月15日はG1とG2が各1個およびG1とG2の混合が1個に認められ、この期間では検出されたNVのコピー数が多い傾向にあった。2月4日、2月12日は全て陰性であった。しかし2月18日はG2が2個から、2月25日はG1とG2が3個から検出され、コピー数はいずれも1,000以下であった。

#### 4) H海域

H海域で5地点について調査した。NV定点1の加熱調理用出荷海域において12月、1月、2月にNVが海水から高いコピー数で検出された。

一方で12月のカキのNV汚染は疑わしいものであったが、1月はG2でカキ1個当たり717コピーと、海水の1Lとほぼ同じ値が検出され、2月は海水1Lのコピー数が95に対し、カキでは1月よりも多く1,946コピーと約3倍に増加していた。

生食用出荷海域においては、1月に483コピーの最高値を示した(検査定点2)、この時の海水のNVは測定値以下であった。11月、12月および3月は陰性あるいは疑わしい程度で、明確に陽性と診断できなかった。

表 4. A 海域におけるカキ(各 1 個)の採取日による NV の汚染状況

採取日	検体数	リアルタイム PCR (×100 copy)				PCR (+)	海域 NV (+)
		陰性	G1	G2	G1+G2		
13.10.9	5	5				0	0
13.11.1	5	5				0	0
13.12.1	5	2	10, 12, 32			2 (G1:1, G2:1)	0
14.1.15	5	2		11, 29, 48		1 (G1:1)	0
14.1.28	5	3		1, 3		1 (G2:1)	0
14.2.4	5	5				1 (G2:1)	0
14.2.12	5	5				0	0
14.2.18	5	5				0	0
14.2.25	5	5				0	0
計	45	27	3	3	2	5 (G1:2, G2:3)	0

表 5. B 海域におけるカキ(各 1 個)の採取日による NV の汚染状況

採取日	検体数	リアルタイム PCR (×100 copy)				PCR (+)	海域 NV (+)
		陰性	G1	G2	G1+G2		
13.10.9	10	10				0	0
13.11.1	10	10				0	0
13.12.1	10	4	10, 16, 23, 296	4, 4		0	0
14.1.15	10	2		0.8, 30, 31, 45	31, 66, 128, 339	6 (G1:1, G2:4, G1+2:1)	0
14.1.28	10	7	2	1, 2		7 (G1:5, G2:1, G1+2:1)	0
14.2.4	10	5	3	1, 2, 4		3 (G1:2, G2:1)	0
14.2.12	10	9		4		1 (G1:1)	0
14.2.18	10	9		9		2 (G1:1, G2:1)	0
14.2.25	10	6	5, 13	8	3	0	0
計	90	62	9	14	5	19 (G1:10, G2:7, G1+2:2)	0

表 6. C 海域におけるカキ(各 1 個)の採取日による NV の汚染状況

採取日	検体数	リアルタイム PCR (×100 copy)				PCR (+)	海域 NV (+)
		陰性	G1	G2	G1+G2		
13.10.9	5	5				0	0
13.11.1	5	5				0	0
13.12.1	5	2	12, 50	3		0	0
14.1.15	5	1	24	5	13, 78	2 (G1:1, G2:1)	0
14.1.28	5	2		1, 2, 4		3 (G1:2, G1+2:1)	0
14.2.4	5	5				1 (G2:1)	0
14.2.12	5	5				1 (G1:1)	0
14.2.18	5	3		4, 5		1 (G1:1)	0
14.2.25	5	2	9, 9	4		0	0
計	45	30	5	8	2	8 (G1:5, G2:2, G1+2:1)	0

表 7. H 海域における海水・カキの NV 汚染状況

検査定 点	採取年月日	塩分濃度 (%)	水温(°C)	海水 NV 量(/l)		カキ NV 量(/個)	
				G 1	G 2	G 1	G 2
1	01/11/15	2.61	20.3	±	±		±
2	01/11/05	2.92	21.4				
3	01/11/13	2.93	20.0				
4	01/11/13	2.93	19.6				
5	01/11/12	2.98	20.4				
1	01/12/03	2.59	16.5	313	258	±	±
2	01/12/03	2.81	17.3	±			
3	01/12/10	2.85	15.7				
4	01/12/10	2.82	14.9				
5	01/12/10	2.95	16.3		±		
1	02/01/15	2.65	12.1	829	±	±	717
2	02/01/15	2.83	12.1			±	483
3	02/01/07	2.85	12.1	±		±	
4	02/01/04	2.81	11.5	±			
5	02/01/22	2.89	11.6				
1	02/02/04	2.71	11.1	95	±	1318	1946
2	02/02/04	2.82	10.8		±		±
3	02/02/05	2.85	10.7				±
4	02/02/05	2.86	10.1				
5	02/02/05	2.93	11.2		±		

定量 PCR において 10 コピー以上を示したものについて、希釈率を乗じ数量化した。10 コピー未満のものは±と示した。海水は 1 リットル当り、カキは 1 個当りのコピー数を示す。検査定点 1 は加熱調理用出荷海域、検査定点 2 - 5 は生食用出荷海域。G 1 : 遺伝子型 I、G 2 : 遺伝子型 II。

4) 海水およびカキから検出された株の系統樹解析

2001/02 年シーズンに検出した 5 株 (海水:S12-1-1、S12-1-2、カキ:oy217、oy219) の系統樹を図 1 に示した。G1 に属するものが 2 株 (Southampton 近縁)

は海水とカキから、G2 に属するものが 3 株で、Mexico 近縁がカキ 2 株、海水 1 株であった。

海水およびカキ共に G1 と G2 の両方が存在し、カキと海水でほぼ同じ配列の

ものも見出された。

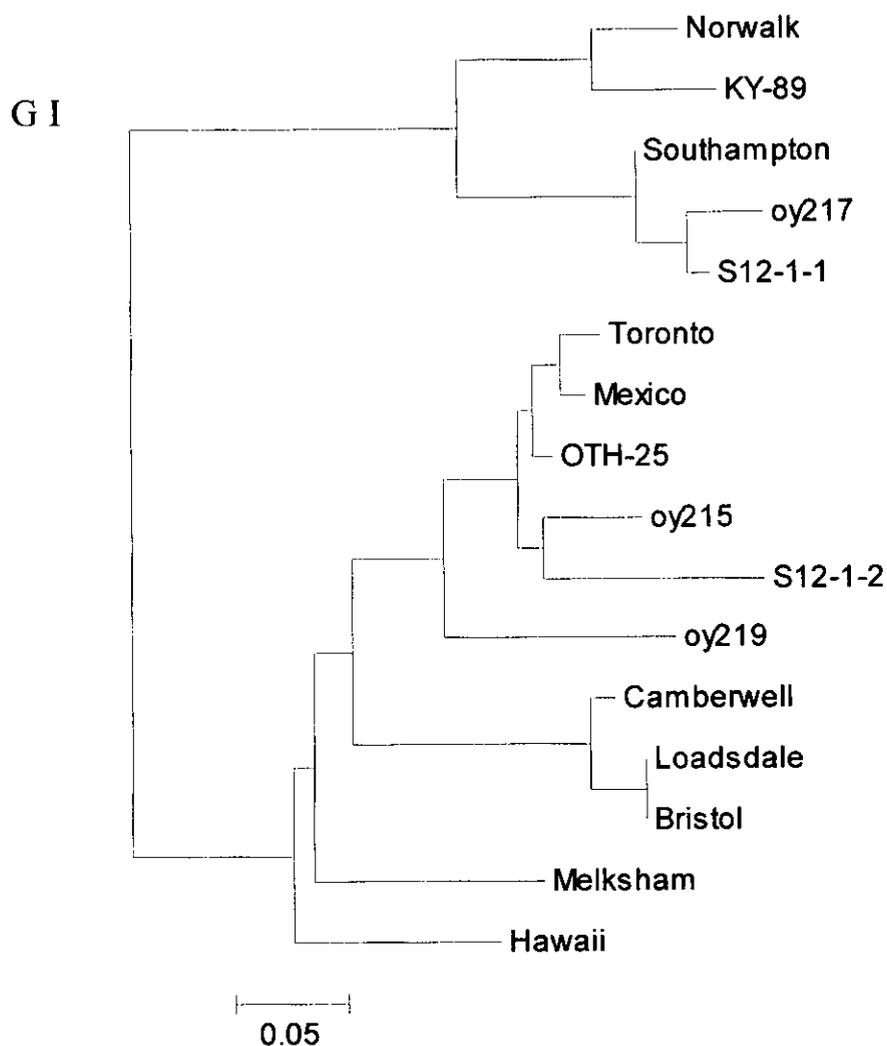


図 1. 海水およびカキから検出された株の系統樹解

E) 研究考察およびまとめ

養殖海域とカキの NV 汚染との関連性において、A、B、C 海域では今回の

調査期間中 NV が検出されなかったが、そこで養殖されていたカキは 1 月をピークとして NV に汚染されていた。しか

しその同一海域で、同じ時期に採取したカキの 5 個あるいは 10 個全てが NV 陽性となることはなかった。このことはカキ関連の食中毒事例原因カキの検査で、必ずしも NV が検出されなかったことと考え合わせると、同じ海域であっても養殖されている筏の上部、あるいは下部、海流の違い等によって汚染状況が異なると推測され、今後海域でのカキの汚染状況をどのようなところで基準を定めるのか、検討すべき重要な課題であると言える。

また今回の海域の海水調査で、海水からは NV が検出されないにも拘わらずカキからはしばしば見出されている。このことはカキが 1 時間に海水を 18L 程度吸引し、そのためにカキの中腸腺で NV が濃縮されると推察され、海水 20L の現在の検査法ではカキの汚染実態を調べるには量的に少ないことを示していると考えられる。従って、今後検査する海水量を増やすかあるいはさらに効率のよい濃縮法を開発しなければならない。もう一つの問題点は海水の NV 量が 20 日後には 1/9 量に減少したにも拘わらず、カキの中の NV 量は 3 倍に増加していることである。このことはカキの中腸腺に NV が蓄積されていることを示しており、検査時の海水 NV 量とカキ NV 量は必ずしも比例しないと判断される。このことから、今後海水の NV 量とカキの汚染にどのような関連性を見出すのかを検討しなければならない。

#### 4. リアルタイム PCR 法の検討

##### A) 研究目的

リアルタイム PCR 法の再現性と処理するカキの個数について検討した。

##### B) 研究方法

リアルタイム法は前述に方法に従って行なった。

##### C) 研究成績

同一の cDNA を用いて再度リアルタイム PCR を実施し、再現性を検討した (表 8-1.2)。G1 では 35 検体が 2 回とも陰性であり、5 検体は 2 回とも数値がでており、残り 9 検体は結果が一致しなかった。G2 は 55 検体のうち 24 検体は 2 回とも陰性であり、11 検体は 2 回とも数値が出たが、このうちコピー数のオーダーまで一致したのは生食用カキ 3 検体、加熱用カキ 5 検体の合計 8 検体であった。残り 26 検体は 2 回実施したリアルタイム PCR の結果が一致しなかった。

表 9 は中腸腺 5 個からの抽出と、その 5 個のそれぞれから少量ずつ採取して抽出した場合および抽出に用いる検体量を増加した場合の遺伝子検出状況を示した。中腸腺を 5 個まとめて処理をしたものよりも 1 個ずつ少量をとり処理をしたものの方が中腸腺 1 g あたりに換算して  $10^1$  から  $10^2$  倍高い数値を示した。

##### D) 研究考察およびまとめ

中腸腺 5 個を 1 検体とした処理では、生食用カキからは食中毒関連、非関連を問わず多くは 10 コピー未満の数値しか得られなかった。糞便からの NV 遺伝子検出のためにリアルタイム PCR を検討