

キからも NV が検出された。

D. 考察

二流行期にわたり、2 食料品店で販売されている市販カキ 95 ロット 285 検体について NV 及び HAV の汚染状況について調査した。NV では、汚染がほぼないと考えられるもの(定量値 0 コピー/個)は 26 ロット(27.4%), 139 検体(48.8%), 逆に汚染がほぼ確実と考えられるもの(定量値 100 コピー/個以上)は 28 ロット(29.5%), 41(14.4%)検体であり、市販カキの多くが NV に汚染していることが明らかになった。さらに 1000 コピー/個以上の高濃度 NV が 8 ロット(8.4%), 9 検体(3.2%)から検出された。一方、HAV については 37 ロット 272 検体について検査した結果、1 検体が 8.1 コピー/個の低値を示した以外はすべて 0 コピー/個であり HAV 汚染はほぼないと考えられた。

流行期別の NV 汚染状況をみると、2003/04 年流行期は 2002/03 年流行期と比較し、明らかに汚染率、汚染量とも低い傾向を示した。当所においては、他の多くの自治体からの遡り調査を含めカキの関連が疑われる胃腸炎集団発生事例を過去 3 年間に平均 14 件(2000/01 年:15 事例, 2001/02 年:15 事例, 2002/03 年:14 事例)の検査を行っているが、2003/04 年流行期は 2 事例と極めて少なかった。2003/04 年流行期のカキ関連事例が少ない傾向にあったことは他の自治体の検査担当者からも報告されており、このことは全国的な傾向であったものと推察される。これらのことから、カキの NV 汚染率や汚染量の低下がカキ関連食中毒事例の低下と密接に関連している可能性が示唆される。さらに、2003/04 年流行期はカキ関連事例が少ないという特異的な流行期であ

ることから、その要因の解明が今後のカキ衛生対策に結びつく可能性があり、今後、気温、雨量、海水の水温や塩分濃度などの気象条件や環境条件との関連など多角的な側面から詳細に検討することが重要と考えられる。

NV 汚染の経時変化をみると、汚染率及び汚染量ともに明確な消長が観察された(表 5)。すなわち、全ての採取時期の検体から NV が検出されたものの、2002/03 年流行期では生食用カキは 1 月前半、加熱調理用カキは 12 月後半をピークとした後、以降減少傾向を示し、2003/04 年流行期では生食用カキ、加熱調理用カキとも 11 月から 1 月に多く検出され、2 月はほとんど検出されなかった。2003/04 年流行期に発生したカキ関連事例のうち 1 例は 11 月後半に発生しており(他の 1 例は 3 月後半)、同流行期に最も高濃度の NV 汚染がみられた時期と一致した。

同一ロットのカキ 3 個における NV 定量値の分布を調べた結果(表 4)、それぞれのカキの NV 定量値に 10^1 オーダー以上の差が 60%に、 10^2 オーダー以上の差が約 40%に認められ、さらに 1000 コピー/個以上の NV 汚染カキが含まれていた 11 ロットのうち、7 ロットは NV 陰性(0 コピー/個)のカキも含まれており、同一ロット内のカキの NV 量に個体差があることが明らかになった。このことは、市販カキの NV 汚染調査あるいは集団胃腸炎発生時の食品検査の場合複数のカキについて検査を行う必要性があることを示している。さらにこのことはカキを原因とする胃腸炎集団発生において、カキを喫食しているにもかかわらず発症しない例があることの宿主以外の要因の一つと考えられる。

生食用カキと加熱調理用カキの NV 汚染状況を比較した結果(表 3, 表 5)、汚染率、

汚染量などいずれの比較項目においても生食用カキの NV 汚染が少ない傾向を示したものの、明らかに汚染程度が少ないと結論できる違いは認められなかった。このことは、生食用カキは非加熱での喫食を許可していることから、NV 感染による健康被害発生の危険度はむしろ生食用カキの方が高いことを示唆している。ただしこの結果は、生食用カキあるいは加熱調理用カキとして販売されていたものの検査結果であり、それぞれの養殖海域の NV 汚染を必ずしも比較しているものではない。

今回検査した市販カキの残品にもほぼ同程度の NV 汚染があると考えられるが、すべてのロットの残品をカキフライに調理し 1 家族 3 名で喫食した結果、下痢、嘔吐、発熱等の症状を呈することはなかった。さらに、2003/04 年流行期の生食用カキについては、1 ロットにつき 2 個程度のカキを酢ガキにして 1 名が喫食した(確率的には 100 コピー/個以上の NV を含むカキを約 3 個喫食したことになる)が、同様に胃腸炎症状を呈することはなかった。今回の調査結果は NV の遺伝子を検出したものであり、必ずしも感染性ウイルスの存在を示すものではない。しかし、一般的に 1 本鎖 RNA は自然界に広く分布する RNA 分解酵素の作用を受けやすく、RNA の検出はウイルスが Virion の形態を保持していると考えられることから、遺伝子検出と感染性ウイルスの存在はある程度相関するものと思われる。以上のことは、NV に汚染している場合でも適切に加熱調理して喫食すれば NV 感染の多くは防止できること、ウイルスが含まれるカキを喫食した場合においても、NV に対するレセプターや免疫の有無など宿主側の要因により必ずしも発症しない場合があることを示唆している。

定量 PCR 法で PCR 反応系当たり 10 コピー以下の低定量値の場合、結果の再現性に問題があることが指摘されている。しかし、月別 NV 検出状況をみると(表 5)、NV 汚染が低い時期で低値を示す検体が多く、NV 汚染が高まるとその割合が低下する傾向が認められ、低定量値は少ないウイルス量を反映しているものと思われた。このことから、定量 PCR 法で低値を示した場合、個別の検査結果については、慎重に取り扱う必要があるものの、疫学的にはその定量値は意義を持つと考えられ、さらなるデータの蓄積が必要である。

E. 結論

市販カキのノロウイルス(NV)及び A 型肝炎ウイルス(HAV)の汚染状況を調査した結果、多くの検体から NV 遺伝子が検出され、市販カキの多くは NV に汚染していることが示された。HAV 汚染は極めて少ないものと考えられた。2003/04 年流行期はカキの NV 汚染率、汚染量とも少なく、カキ関連胃腸炎集団発生が少ない事実と一致した。生食用カキは加熱調理用カキと比較し、NV 汚染率、NV 汚染量とも少ない傾向を示したが、生食による NV 感染の危険性は排除できなかった。多くのカキから G1 及び G2 の NV が同時検出され、それぞれの定量値に関連性が認められた。NV の汚染率及び汚染量に経時的变化が観察された。同一ロットに含まれるカキの NV 汚染レベルは、個体ごとに差が認められた。

F. 研究発表

1. 論文発表

野田 衛, 西尾 治, 秋山美穂, 国井悦子, 藤井彰人, 池田義文, 平崎和孝, 荻野武

雄:市販カキにおけるノロウイルスの定量的汚染調査, 広島市衛生研究所年報, 22, 61-66, 2003

2. 学会発表

野田 衛, 西尾 治, 国井悦子, 藤井彰人, 池田義文, 平崎和孝, 荻野武雄:市販カキにおけるノロウイルスの定量的汚染調査, 全国公衆衛生獣医師協議会平成 15 年度調査研究発表会, 2003 年 9 月 5 日, 東京都

表 1-1 ロット別、流行期別 NV 汚染状況

NV 定量 PCR の結果	意義	2002/03 年 (N=41)		2003/04 年 (N=54)		計(N=95)	
		件数	%	件数	%	件数	%
G1T=0 かつ G2T=0	NV の汚染がほぼない	4	9.8	22	40.7	26	27.4
G1T>0 または G2T>0	NV の汚染が疑われる	37	90.2	32	59.3	69	72.6
G1T≥100 または G2T≥100	NV に汚染している	21	51.2	7	13.0	28	29.5
G1T≥1000 または G2T≥1000	高濃度の NV に汚染している	7	17.1	1	1.9	8	8.4

表 1-2 個体別、流行期別 NV 汚染状況

NV 定量 PCR の結果	意義	2002/03 年 (N=123)		2003/04 年 (N=162)		計(N=285)	
		件数	%	件数	%	件数	%
G1T=0 かつ G2T=0	NV の汚染がほぼない	30	24.4	109	67.3	139	48.8
G1T>0 または G2T>0	NV の汚染が疑われる	93	75.6	53	32.7	146	51.2
G1T≥100 または G2T≥100	NV に汚染している	34	27.6	7	4.3	41	14.4
G1T≥1000 または G2T≥1000	高濃度の NV に汚染している	8	6.5	1	0.6	9	3.2

G1T(G2T):G1(G2)の定量値

表 2-1 ロット別 NV 定量値分布

定量値	G1		G2		HAV 件数
	件数	%	件数	%	
0	36	37.9	33	34.7	90
0<~<1	5	5.3			
1~<10	15	15.8	6	6.3	1
10~<100	24	25.3	30	31.6	
100~<1000	12	12.6	18	18.9	
1000~	3	3.2	8	8.4	
計	95	100	95	100	91
平均値	175.7		225.8		
最大値	7150.0		4993.8		

表 2-2 個体別 NV 定量値分布

定量値	G1		G2		HAV 件数
	件数	%	件数	%	
0	182	63.9	158	55.4	271
0<~<1	15	5.3	4	1.4	
1~<10	27	9.5	12	4.2	1
10~<100	41	14.4	72	25.3	
100~<1000	16	5.6	30	10.5	
1000~	4	1.4	9	3.2	
計	285	100	285	100	272
平均値	68.6		101.2		
最大値	7150.0		4993.8		

各ロットにつき最大の値を示した個体の結果を各ロットの値とした。

表 3 生食用カキと加熱調理用カキとの汚染状況の比較

NV 定量 PCR の結果	意義	生食用(N=156)		加熱調理用(N=129)	
		件数	%	件数	%
G1T=0 かつ G2T=0	NV の汚染がほぼない	78	50.0	61	47.3
G1T>0 または G2T>0	NV の汚染が疑われる	78	50.0	68	52.7
G1T≥100 または G2T≥100	NV に汚染している	22	14.1	19	14.7
G1T≥1000 または G2T≥1000	高濃度の NV に汚染している	4	2.6	5	3.9

G1T(G2T):G1(G2)の定量値

表4 同一ロットに含まれるカキ個体別のNV定量結果

同一ロットのカキの NV定量値	延ロット数 (%)	延ロット数	NV定量値(カキ中腸腺1個当たりのコピー数)						
			0	0<~<1	1~<10	10~<100	100~<1000	1000~	
3個とも同じレベル	75 (39.5)	69	●●●●●						
		6				●●●●●			
1個が異なるレベル	82 (43.2)	4	●●●	●					
		11	●●●		●				
		22	●●●			●			
		2	●●●				●		
		1	●●●					●	
		1	●	●●					
		5	●		●●				
		15	●				●●		
		4	●					●●	
		1	●						●●
		2		●●		●			
		1			●●		●		
		1			●		●●		
		1				●		●●	
		5					●●	●	
		4					●	●●	
1					●		●●		
1						●●	●		
3個とも異なるレベル	33 (17.4)	3	●	●	●				
		3	●	●		●			
		1	●	●			●		
		6	●		●	●			
		1	●		●		●		
		8	●			●	●		
		2	●			●		●	
		3	●				●	●	
		2		●			●		
		2			●	●	●		
2					●	●			

ロット数はG1及びG2各95ロットの合計(延190ロット)の集計

●は定量結果が各定量値レベルの範囲内にあったカキ1個を示す。

図1 カキにおける G1 定量値と G2 定量値の相関

定量値 0 コピー/個は 0.001 として作図した。

全体(N=285)の相関係数は 0.89。

G1とG2が陽性の検体(N=84)の相関係数は 0.89。

G1 定量値=0 かつ G2 定量値=0 139 検体

G1 定量値=0 かつ G2 定量値>0 43 検体

G1 定量値>0 かつ G2 定量値=0 19 検体

G1 定量値>0 かつ G2 定量値>0 84 検体

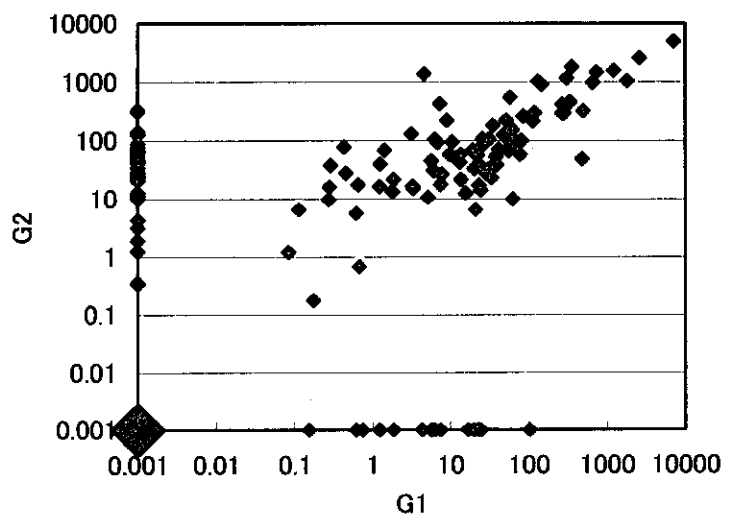


表5 生食用/加熱調理用区分別、月別NV汚染状況

種類	区分	G1 定量値	2002年12月		2003年1月		2月		11月		12月		2004年1月		2月		流行情形別		合計
			前半	後半	前半	後半	前半	後半	前半	後半	前半	後半	前半	後半	前半	後半	02/03	03/04	
G1	生食用	0	23	7	4	1	2	7	5	7	9	9	3	7	17	12	37	69	106
		0<~<1	1	1		4							1	1			6	3	9
		1~<10	2		1	2	3							1	1		8	4	12
		10~<100	1	6	2	4			4					1			13	6	19
		100~<1000		1	4	2			1								7	2	9
		1000~				1											1	0	1
		平均値	0.9	47.8	300.6	82.5	1.0	17.7	55.8	0.0	56.1	3.0	0.8	0.0	0.0	0.0	70.9	16.2	41.4
		最大値	13.0	500.6	1806.3	293.8	3.3	78.1	478.1	0.0	666.3	15.6	6.9	0.0	500.6	666.3	1806.3		
		0	4	6	4		3	4	5	12	9	10	7		12	17	59	76	
		0<~<1	2		1		3										6	0	6
1~<10	3				3	3		2	2	1	1				9	6	15		
10~<100		4	3	4		5	2	1	1	1	1				11	11	22		
100~<1000		3	1	2			1								6	1	7		
1000~		2				1									2	1	3		
平均値	2.0	306.2	51.9	44.9	1.4	19.9	810.8	1.7	2.6	1.6	3.7	0.0	0.0	107.7	97.2	101.4			
最大値	9.0	2612.5	271.0	120.1	7.5	61.9	7150.0	13.8	22.5	16.9	28.8	0.0	2612.5	7150.0	7150.0				
G2	生食用	0	16	1	3	1	2	4	5	6	3	8	17	11	23	63	86		
		0<~<1	1			1										2	0	2	
		1~<10				1						2		1	1	1	4	5	
		10~<100	7	9	3	4	5	4	3	5	1	1				28	14	42	
		100~<1000	2	5	3	4		1	1							14	3	17	
		1000~	1		3											4	0	4	
		平均値	92.5	111.6	451.8	149.9	10.4	29.7	22.4	91.8	3.8	10.4	0.4	153.3	20.2	81.6			
		最大値	1399.9	325.0	1833.8	423.8	21.4	142.5	129.4	0.0	988.1	12.5	93.8	4.4	1833.8	988.1	988.1		
		0	3	2	1		3	4	8	8	8	10	7		12	9	63	72	
		0<~<1			2											2	0	2	
1~<10		1	1		2			1	1	1	1			4	3	7			
10~<100	4	5	3	5	3	4	1	3	1	1	1			20	10	30			
100~<1000	2	3	2	4	1	1								12	1	13			
1000~		4				1								4	1	5			
平均値	59.4	552.6	77.1	105.9	20.5	37.2	554.9	1.5	4.1	2.0	3.4	0.0	208.9	69.9	124.9				
最大値	221.5	2606.3	296.3	304.8	131.7	153.1	4993.8	21.9	24.4	21.9	27.5	0.0	2606.3	4993.8	4993.8				

表 6-1 養殖海域別、月別 NV(G1)汚染状況

養殖海域	G1 定量値	2002年12月		2003年1月		2月		11月		12月		2004年1月		2月		流行情形別			合計	
		前半	後半	前半	後半	前半	後半	前半	後半	前半	後半	前半	後半	前半	後半	02/03	03/04			
KR 湾 生食用	0	9	4	3		1	2					3		2	6	17	13	30		
	0<~<1		1			1						1			2		1	3		
	1~<10					1						1		1		1	2	3		
	10~<100		4	1			1						1		5	2	2	7		
	100~<1000			2									1		2	0	0	2		
	平均値	0.0	8.8	185.1		1.2	7.9						3.0		0.6	0.0	44.2	2.4	27.5	
最大値	0.0	24.3	733.1		3.3	23.8						15.6		1.9	0.0	733.1	23.8	733.1		
H 県海域 生食用	0									3	4							7	7	
	1~<10										1							1	1	
	100~<1000										1							1	1	
	平均値									0.0	112.1							74.7	74.7	
最大値									0.0	666.3								666.3	666.3	
H 県中部海域 生食用	0													6				6	6	
	平均値													0				0	0	
	最大値													0				0	0	
	0													9				9	9	
H 湾中部海域 生食用	0																		0.0	0.0
	平均値													0.0					0.0	0.0
	最大値													0.0					0.0	0.0
	0	4					2			6						4	8	12		
H 湾南部海域 生食用	1~<10	2														2	0	2		
	10~<100	0					1								0	1	1			
	平均値	2.0					26.0			0.0					2.0	8.7	6.0			
	最大値	7.4					78.1			0.0					7.4	78.1	78.1			
	0					1	3								1	3	4			
	0<~<1					2									2	0	2			
H 湾南部海域 生食用	1~<10					1										3	0	3		
	10~<100						3									4	3	7		
	100~<1000														2	0	2			
	平均値						13.5								62.2	13.5	46.0			
	最大値					82.5	1.3	33.8							293.8	33.8	293.8			
						293.8	3.3											293.8		

表 6-1 続き

HR 湾 生食用	0	10	1	1	1	1	1	5	5	7	6	13	23	36	
	0<~<1	1								1	1	2	2	4	
	1~<10			1						1		2	1	3	
	10~<100	1		1								3	0	3	
	100~<1000			1	2			1				3	1	4	
	1000~				1							1	0	1	
	平均値	1.1	184.1	416.1			0.7	79.7	0.1	0.8	0.0	127.7	18.0	69.6	
	最大値	13.0	500.6	1806.3			1.8	478.1	0.6	6.9	0.0	1806.3	478.1	1806.3	
	0			2									2	0	2
	10~<100			1									1	0	1
MT 湾 生食用	平均値			28.5								28.5	0.0	28.5	
	最大値			85.6								85.6	0.0	85.6	
	0	3	3	3	3	4	3	4	10	7	8	12	48	60	
	0<~<1			1								4	0	4	
	1~<10				3	3	3	2	2	1		6	5	11	
	10~<100			3	1	4	5	1				8	6	14	
	100~<1000			3	1	2						6	1	7	
	平均値	0.0	78.2	56.4	44.9	1.4	19.9	21.1	1.0	1.0	0.2	40.5	5.5	18.6	
	最大値	0.0	305.2	271.0	120.1	7.5	61.9	102.5	6.3	7.5	1.9	305.2	102.5	305.2	
	H 湾 加熱調理用	0							1	2	2	3		11	11
1~<10													1	1	
10~<100								1	1	1			5	5	
1000~							1						1	1	
平均値								2390.0	4.6	7.5	5.6	11.0	403.1	403.1	
最大値								7150.0	13.8	22.5	16.9	28.8	7150.0	7150.0	
0		1	3	1								5		5	
0<~<1		2										2		2	
1~<10		3										3		3	
10~<100				1	2							3		3	
1000~			2								2		2		
平均値	2.9	648.2	43.0								269.0		269.0		
最大値	9.0	2612.5	67.0								2612.5		2612.5		
H 湾西部海域 加熱調理用	0														
	0<~<1														
	1~<10														
	10~<100														
	1000~														
	平均値														
	最大値														

表 6-2 養殖海域別、月別 NV(G2)汚染状況

養殖海域	G2 定量値	2002年12月		2003年1月		2月		11月		12月		2004年1月		2月		流行期別			合計
		前半	後半	前半	後半	前半	後半	前半	後半	前半	後半	前半	後半	前半	後半	02/03	03/04		
KR湾 生食用	0	9	1	2				2					3	5	12	13	25		
	1~<10												2	1	0	3	3		
	10~<100		7	2		3									12	1	13		
	100~<1000		1	1				1							2	1	3		
	1000~			1											1	0	1		
	平均値	0.0	74.8	348.3		18.3		43.1					3.8	0.0	0.7	104.4	8.7	66.1	
最大値	0.0	311.3	1505.0		21.4		129.4					12.5	0.0	4.4	1505.0	129.4	1505.0		
H 県海域 生食用	0									3	3						6	6	
	10~<100										2						2	2	
	100~<1000										1						1	1	
	平均値									0.0	170.3						113.5	113.5	
	最大値									0.0	988.1						988.1	988.1	
	0													6			6	6	
H 県中部海域 生食用	平均値													0			0	0	
	最大値													0			0	0	
	0													8			8	8	
	1~<10													1					
	平均値													0.3			0.3	0.3	
	最大値													3.1			3.1	3.1	
H 湾中部海域 生食用	0	1						1		6							1	7	8
	10~<100	2						2									2	2	4
	100~<1000	2															2	0	2
	1000~	1																	
	平均値	382.3						28.8		0.0							382.3	9.6	158.7
	最大値	1399.9						57.5		0.0							1399.9	57.5	1399.9
H 湾南部海域 生食用	0				1	1		3									2	3	5
	1~<10					1											1	0	1
	10~<100				4	1		2									5	2	7
	100~<1000				4			1									4	1	5
	平均値				149.9	8.4		30.1									114.5	30.1	86.4
	最大値				423.8	15.4		142.5									423.8	142.5	423.8

表 6-2 続き

HR 湾 生食用	0	6	1	1	3	3		8	6	8	20	28
	0<~<1	1		1						2	0	2
	10~<100	5	1	1	3		1			8	7	15
	100~<1000		2	2						4	0	4
	1000~		2							2	0	2
	平均値	16.9	192.0	555.3	4.6	12.0	13.3	10.4	0.0	171.9	9.1	85.7
	最大値	65.0	325.0	1833.8	13.7	49.4	42.5	93.8	0.0	1833.8	93.8	1833.8
MT 湾 生食用	10~<100		1							1		1
100~<1000		2								2		2
平均値		141.69								141.69		141.69
最大値		267.5								267.5		267.5
H 県海域 加熱調理用	0	3	2	3	4	6	12	8	9	8	51	59
	0<~<1		2							2	0	2
	1~<10		1	2						3	1	4
	10~<100		2	5	4		1			12	7	19
	100~<1000		2	4	1					9	1	10
	1000~		2									
	平均値	0.0	420.3	97.6	105.9	37.2	0.0	0.0	0.0	0.0	152.9	6.6
最大値	0.0	1174.4	296.3	304.8	153.1	0.0	0.0	0.0	0.0	1174.4	153.1	1174.4
H 湾 加熱調理用	0					2	2	2	3		12	12
	1~<10							1			2	2
	10~<100						1	1			3	3
	1000~					1					1	1
	平均値					1664.6	7.3	4.0	0.0	0.6	10.2	281.1
	最大値					4993.8	21.9	11.9	1.9	27.5	1993.8	1993.8
	0			1							1	1
H 湾西部海域 加熱調理用	1~<10			1						1		1
	10~<100		4	3	1					8		8
	100~<1000		2	1						3		3
	1000~		2							2		2
	平均値	89.1	751.0	36.0						343.2		343.2
	最大値	221.5	2606.3	98.1						2606.3		2606.3

平成 15 年度厚生労働科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）

食品中の微生物汚染状況の把握と安全性の評価に関する研究

分担研究項目：市販生カキのノロウイルス汚染について

研究協力者	山口県環境保健研究センター	西田 知子
	北海道立衛生研究所	吉澄 志磨
	青森県環境保健研究センター	三上 稔之、筒井 理華、石川 和子
	埼玉県衛生研究所	篠原 美千代、瀬川 由加里、 内田 和江、島田 慎一、土井 りえ
	長野県衛生公害研究所	徳竹 由美
	大阪市立環境科学研究所	入谷 展弘
	広島県保健環境センター	福田 伸治
	愛媛県立衛生環境研究所	近藤 玲子、山下 育孝、 豊嶋 千俊
	鳥取県衛生研究所	川本 歩
	佐賀県衛生薬業センター	安藤 克幸
	国立感染症研究所	愛木 智香子、加藤 由美子、 齋藤 利江、秋山 美穂
主任研究者	国立感染症研究所	西尾 治

研究要旨

2003 年 10 月から 2003 年 3 年に採取した市販生カキにおけるノロウイルス（NV）の汚染状況を調査し、ウイルス学的安全性を評価の基礎資料を得ることを目的とした。リアルタイム PCR 法により NV の検出を行った結果、カキ 1 個の中腸線、あるいは中腸線 1g あたり実測値 10 コピー以上検出されたものは、生食用カキ 323 検体中 31 検体（10%）、加熱用カキ 34 検体中 2 検体（6%）であった。そのうち 1000 コピー/1g 以上の NV 汚染量を示したものは、生食用カキで 8 検体（2.5%）、加熱用カキで 1 検体（2.9%）に認められた。

A. 研究目的

NV による食中毒事例の原因食品として、カキを介する事例が多く発生しており、カキのウイルス学的安全性の確保が緊急の課題となっている。そこで、市販されている生カキの NV 汚染状況を調査し、NV 汚染実

態を明らかにすることを目的とした。

B. 検査材料

2003 年 10 月から 2004 年 3 月の間に市販された生食用カキ 323 検体と、2003 年 11 月から 2004 年 2 月に市販された加熱用カキ

34 検体を検査対象とした。

C. 検査方法

市販カキはパック詰めのものを買上げ、1 パック当たり 3 個のカキについて検査を行い、最も高い値を示したものをそのパックのカキ汚染量とした。カキは中腸腺を取り出しホモジナイズした後、10%乳剤とし、10,000rpm20min 遠心後の上清を超遠心法またはポリエチレングリコールによる濃縮方法にて濃縮し、RNA 抽出に用いた。RNA 抽出は QIAamp Viral RNA Mini キット (QIAGEN) を用い、抽出 RNA は DNase I 処理後、random hexamer (Amersham Pharmacia) を用いて Super Script II RT (Invitrogen) で逆転写し、cDNA を合成した。この cDNA を用いて、リアルタイム PCR 法および RT-PCR 法で NV および HAV の検出を行った。

NV の RT-PCR 法のプライマーは、1st PCR では、genogroup1 (G1) が COG1F/G1SKR、genogroup2 (G2) が COG2F/G2SKR および ALPF/G2ALSKR を用い、Nested PCR では、G1 が G1SKF/G1SKR、G2 が G2SKF/G2SKR および G2SKF/G2ALSKR を用いた。HAV のプライマーは、1st PCR では HAV+2798/HAV-3273 を用い、Nested PCR では、HAV+2907/HAV-3162 を用いた。RT-PCR 法で陽性となった PCR 産物は遺伝子配列を決定し、NJ 法で系統樹作成を行った。リアルタイム PCR 法は、NV は G1 がプライマー：COG1F/COG1R、プローブ：RING1-TP(a)、RING1-TP(b)、G2 がプライマー：COG2F、ALPF/COG2R、プローブ：RING2AL-TP を用い行った。HAV は、プライマー：HAV+449/HAV-557、プローブ：HAV+482-P-FAM を用いて行った。

D. 研究結果

リアルタイム PCR 法で検査を実施し、カキ 1 個の中腸腺、あるいは中腸腺 1g あたり実測値 10 コピー以上検出されたものを陽性と判定した。また 1 検体につき 3 個を別々に検査し、最も高い値をその検体の NV 量とし、G1 と G2 が同一の検体で検出された場合は、双方を合算した値をその検体の NV 量とした。

1) 市販生食用カキの NV 汚染状況 (表 1) 検査した 323 検体中 31 件 (10%) NV がリアルタイム PCR の実測値 10 コピー以上であり、陽性とした。月別では、陽性率の高かった月は 11 月の 19% で、1 月および 2 月は 11% で、12 月は 7% の汚染率であった。3 月は陽性と判定された検体は見られなかった。リアルタイムの 1 個当たりの汚染量 0~< 125 コピーの間はすなわち完全に陰性とは判断されないグレーゾーンの検出状況は、127 検体 (39%) がこの値であった。検出率の高かった月は 11 月が 81%、次いで 10 月の 56%、12 月の 43% であった。

また、1000 コピー/1 個以上の NV 汚染は、12 月 2 件、1 月 5 件、2 月の 1 件の計 8 件 (2.5%) に見られた。

決定された遺伝子型は、C-15 が 11 件、C-16 が 8 件、C-10 が 6 件、C-1、C-2、C-6、C-22 が各々 1 件検出された。

カキから A 型肝炎ウイルス遺伝子を 2004 年 1 月採取の市販生食用カキ 1 検体から検出した。その後 2 週間以内に採取された同一海域のカキを 12 ロット検査し、以前のロットについても検査し、その後も調査を継続したが、定量、遺伝子検出共に陰性であった。

2) 市販加熱用カキの NV 汚染状況 (表 2)
34 検体中 2 件 (6%) に NV 汚染が認められたが、この 2 件は 11 月に検査したものであり、11 月以外の月からは陽性と判定された検体は見られなかった。リアルタイムの 1 個当たりの NV 汚染量 $0 \sim < 125$ コピーは 17 件 (50%) に認められた。月別に検出率の高かった月は、12 月で 64%、次いで 11 月の 63%、1 月の 40% であった。

1000 コピー / 1 個以上の汚染は、11 月の 1 件 (2.9%) のみであった。

決定された遺伝子型は、C-1 が 3 件、C-10 が 2 件、C-30、C-33 がそれぞれ 1 件であった。

HAV 遺伝子を 2004 年 1 月採取の市販生食用カキ 1 検体から検出した。その後 2 週間以内に採取された同一海域のカキを 12 ロット検査し、以前のロットについても検査し、その後も調査を継続したが、定量、遺伝子検出共に陰性であった。検出された A 型肝炎ウイルスは 1A 型であった。

E. 考察とまとめ

2003 年 10 月から 2004 年 3 月の間の市販生食用カキの汚染状況について、カキ 1 個の中腸線の実測値 10 コピー以上を示したものは約 10% に認められた。また、 $0 \sim < 125$ コピーの間のグレーゾーンを含めると NV 汚染率は 39% であった。 $0 \sim < 125$ の間の値を示したのものの中には NV 陽性であるものも含まれていることが推察されるので、これらの診断基準の再評価を行う必要がある。

例年ではカキの NV 汚染は 12 月から認められたのに対し、本年度は 10 月から陽性のカキが認められた、例年よりも 2 ヶ月も早

くカキの汚染が認められた。しかし、12 月から 2 月の間の陽性率は例年の半分程度であった。また、この 12 月から 2 月の間は例年に比べ、陽性率は半数程度であり、また汚染量も少なかった。カキによる食中毒事例が平成 15 年 12 月から 16 年 3 月の間は激減したが、このことは同時期のカキ汚染との関連性が示唆された。

多く検出された遺伝子型の中で C-10、C-16 類似株はカキ関連食中毒事例から検出されている遺伝子型であり、カキとカキによる食中毒事例との関連性が分子疫学的に強く示唆された。

2003 年 11 月から 2004 年 2 月に市販された市販加熱用カキの汚染状況は 6% と低い値であったが、例年では生食用カキよりも高く、汚染量も多かった。今年度は 11 月の 2 検体に陽性を認めたのみで、12 月から 2 月間には実測値 10 コピー以上のものは認められなかった。このことはこの採取した海域でのこの期間の降水量が例年に比べ極めて少なかったことによると推察された。

A 型肝炎ウイルスが 1 検体から検出されたので、さらに同海域の多数のカキについて直ちに検査を行ったが、全て陰性であった。このことから一時的に同海域が少量の A 型肝炎ウイルスに汚染されたと推測された。A 型肝炎は潜伏期が長く、平均 1 ヶ月程度と長いことから対策が遅れるので、リアルタイムに検査し、その結果を基に、カキの生食禁止、患者発生の監視を行うなどの対策が必要であり、危機管理体制を確立しておくことが肝要である。

NV 汚染カキは、加熱すれば死滅し食中毒を引き起こすことはないが、十分な加熱を行わなければ食中毒に至る危険性が存在し

ていることが十分推測でき、適切な加熱処理を実践することの重要性を周知徹底することが必要と考える。

F. 研究発表

1. 論文発表

西川 眞：ノーウォークウイルスによる急性非細菌性流行性胃腸炎と小児急性胃腸炎の分子疫学的研究、新潟医学会誌、117:251-264、2003

Nishida T, Kimura H, Saitoh M, Shinohara M, Kato M, Fukuda S, Munemura T, Mikami T, Kawamoto A, Akiyama M, Kato Y, Nishi K, Kozawa K, Nishio O: Detection, quantitation, and phylogenetic analysis of noroviruses in Japanese oysters. *Appl Environl Microbiol.* 69(10):5782-5786, 2003

Kimura H, Saitoh M, Miyakubo H, Yoshida H, Kato M, Nagai A, Kozawa K : Keratoconjunctivitis caused by echovirus type 13 in Japanese children. *Pediatr Infect Dis J.* 22(8):758-759, 2003

Iritani N, Seto Y, Kubo H, Murakami T, Haruki K, Ayata M, Ogura H: Prevalence of Norwalk-like virus infections in cases of viral gastroenteritis among children in Osaka City, Japan. *J Clin Microbiol.* 41:1756-1759, 2003

勢戸祥介、入谷展弘、小倉壽：ウイルスによる食中毒、医薬ジャーナル、39：1457-1461、2003

入谷展弘、久保英幸、勢戸祥介、春木孝祐、西尾治、武田直和、村上司、簗城昇次、改田厚、綾田稔、小倉壽：平成14年度に検出されたノーウォークウイルスの遺伝子型別、大阪市立環境科学研究所報告 調査・研究年報、平成14年度版 第65集：29-37、2003

入谷展弘、勢戸祥介：ノロウイルス感染症、生活衛生、47：34-39、2003

西田知子、野田衛、三上稔之、篠原美千代、春木孝祐、大瀬戸光明、加藤由美子、秋山美穂、西尾治：市販生食用カキのノロウイルス汚染状況、病原微生物検出情報、24：317、2003

西尾治、西香南子、福田伸治、西田知子、篠原美千代、三上稔之、沖村容子、新川奈緒美、杉枝正明、古屋由美子、大瀬戸光明、鈴木宏：ウイルス性食中毒の病因、臨床とウイルス、31：163-170、2003

川本歩、松本尚美、細井亮：ヒトと環境およびカキから検出した Norwalk Virus の疫学的検討、鳥取県衛生研究所報、41:35-39、2001

川本歩、松本尚美、細井亮：イワガキと海水からの小型球形ウイルス調査結果、鳥取県衛生研究所報、42：64-65、2002

野田衛、西尾治、秋山美穂、国井悦子、藤井彰人、池田義文、平崎和孝、荻野武雄：市販カキにおけるノロウイルスの定量的汚染調査、広島市衛生研究所年報、22:61-66、2003

篠原美千代:SRSVの検査法、HACCP、9:30-33、2003

安藤克幸、森永康裕、藤原義行:生食用カキの採取海域海水、感染性胃腸炎及び食中毒事例からのノロウイルスの検出、佐賀県衛生薬業センター所報、28、2004

福田伸治、高尾信一、桑山勝、島津幸枝、宮崎佳都夫:ウイルス性食中毒の発生の特徴、日本食品微生物学会雑誌、20(4):203-209、2003

福田伸治、宮崎佳都夫:乳幼児感染性胃腸炎患者における Norwalk virus, Sapporo virus および Human astrovirus の検出状況と流行型、感染症学雑誌、77:965-970、2003

Fukuda S, Takao S, Shimazu Y, Miyazaki K : An application of microplate hybridization assay for the confirmation and probe typing of "Norwalk-like viruses". Microbiol Immunol. 46(7):495-498, 2002

Fukuda S, Takao S, Shimazu Y, Miyazaki K : Prevalence of Norwalk viruses in Southern and Northern parts of Hiroshima Prefecture, Japan in 2000/2001 season. Jpn J Infect Dis. 54:153-154, 2001

Li L, Shimizu H, Doan LTP, Tung PG, Okitu S, Nishio O, Suzuki E, Seo JK, Sim JG, Muller WEG, Ushijima H : Characterizations of Adenovirus Type 41 isolates from children with acute gastroenteritis in Japan, Vietnam and Korea. J Clin Microbiol (in press)

木洋、秋山和夫、渡辺徹、大村達夫:遺伝子相同性にもとづく Norovirus (NV) のカキへの汚染経路の解明、環境工学研究論文集、40:607-616、2003

西尾治:ノロウイルス検査法の改訂、食品衛生研究、54(2):9-15、2004

西尾治:ノロウイルスによる食中毒の発生とその防止について、Kewpie News、357号、2003

2. 学会発表

森伸生、砂川富正、多屋馨子、谷口清州、西尾治、岡部信彦:2002年に感染症発生病向調査へ報告されたA型肝炎のまとめ、第44回臨床ウイルス学会、2003年6月26-27日、鹿児島

新川奈緒美、吉澄志磨、福田伸治、西香南子、杉枝正明、古屋由美子、三上稔之、西田知子、牛島廣治、秋山美穂、岡部信彦、西尾治:全国各地で発生したノロウイルス(NV)による食中毒事例について、第51回日本ウイルス学会、2003年10月27-29日、京都

西田知子、野田衛、三上稔之、篠原美千代、春木孝祐、大瀬戸光明、秋山美穂、西尾治：市販生食用カキのノロウイルスおよびA型肝炎ウイルス汚染状況、第51回日本ウイルス学会、2003年10月27-29日、京都

西香南子、福田伸治、篠原美千代、大瀬戸光明、植木洋、西尾治：カキ及び養殖海域のNV汚染調査とカキ筏における水平垂直分布調査、第51回日本ウイルス学会、2003年10月27-29日、京都

勢戸祥介、入谷展弘、久保英幸、改田厚、春木孝祐、西尾治、綾田稔、小倉壽：平成14年度に大阪市で検出されたNorwalk virusの遺伝子型別、第51回日本ウイルス学会、2003年10月27-29日、京都

宗村徹也、七種美和子、川上千春、野口有三、藤本嗣人、近平雅嗣、吉田弘：分子系統学的手法によるエンテロウイルス同定のためのクラスタリング尺度の設定、第44回日本臨床ウイルス学会、2003年、鹿児島

新川奈緒美、伊東祐治、西尾治、他：ノーウォークウイルスによる食中毒事例と排泄

されるウイルス量について、第44回鹿児島県公衆衛生学会、2002年、鹿児島

新川奈緒美、中山浩一郎、湯又義勝、西尾治：Norwalk virusによる集団発生事例の疫学と患者から排泄されるウイルス量、第28回九州衛生環境技術協議会、2002年、宮崎

新川奈緒美、中山浩一郎、伊東祐治、西尾治：Norwalk virusによる胃腸炎集団発生患者から排泄されるウイルス量と遺伝子型について、第50回日本ウイルス学会、2002年、札幌

神田隆、杉枝正明、乾あやの、秋山美穂、西尾治：胃腸炎患者および健康人からのNorovirusの検出について、第45回日本臨床ウイルス学会、2004年6月、大阪

野田衛、西尾治、国井悦子、藤井彰人、池田義文、平崎和孝、荻野武雄：市販カキにおけるノロウイルスの定量的汚染調査、全国公衆衛生獣医師協議会平成15年度調査研究発表会、2003年9月5日、東京

表1: 生食用カキにおける月別NV汚染状況

月	検査数	陽性数	陽性率	リアルタイムPCRコピー数(1個)							>0 検体数	>0 検出率	遺伝子型 (件数)	
				0	>0 ~ <60	≥60 ~ <125	≥125 ~ <300	≥300 ~ <500	≥500 ~ <1000	≥1000				
10	9	1	11%	8	4	0	0	0	0	1	0	5	56%	—
11	37	7	19%	26	23	0	5	0	0	2	0	30	81%	C-2(1)
12	104	7	7%	71	35	3	2	2	1	2	0	45	43%	C-1(1) C-10(6) C-15(11) C-16(3)
1	95	10	11%	44	14	4	4	1	0	5	0	28	29%	C-16(5) C-22(1)
2	57	6	11%	33	7	5	3	1	1	1	1	18	32%	C-6(1)
3	21	0	0%	14	6	1	0	0	0	0	0	7	33%	—
合計	323	31	10%	196	83	13	14	4	5	8	127	39%	7種類	

表2: 加熱用カキにおける月別NV汚染状況

月	検査数	陽性数	陽性率	リアルタイムPCRコピー数(1個)							>0 検体数	>0 検出率	遺伝子型 (件数)	
				0	>0 ~ <60	≥60 ~ <125	≥125 ~ <300	≥300 ~ <500	≥500 ~ <1000	≥1000				
11	8	2	25%	3	0	3	1	0	0	1	0	5	63%	C-1(2) C-10(1)
12	11	0	0%	4	7	0	0	0	0	0	0	7	64%	C-1(1)
1	10	0	0%	6	4	0	0	0	0	0	0	4	40%	—
2	5	0	0%	4	1	0	0	0	0	0	0	1	20%	C-10(1) C-30(1) C-33(1)
合計	34	2	6%	17	12	3	1	0	0	1	17	50%	4種類	

平成 15 年度厚生労働科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）
分担研究報告書

食品中の微生物汚染状況の把握と安全性の評価に関する研究
分担研究項目 養殖カキのノロウイルス汚染状況

研究協力者 宮城県保健環境センター 微生物部 植木 洋, 山木紀彦,
渡邊 節, 沖村容子, 秋山和夫
主任研究者 国立感染症研究所 感染症情報センター第六室 西尾 治

研究要旨

環境水とかき汚染の実態を定量的に把握することを目的とし、かきの NV 汚染経路と養殖海域および流入河川水との関連を調査したところ、検出時期は異なるが河川水およびかきから検出された NV の遺伝子型は一致しており、養殖かきへの NV の汚染経路は、胃腸炎患者～下水処理場～河川水～かきの経路を遺伝子学的に裏付けることができた。

筏内での養殖かきの NV 汚染の分布を把握することを目的とし、同一のかき筏を対象に NV の水平垂直分布調査を実施したが、調査対象とした養殖筏が陸地から約 2km の沖合の外湾にあることなどで河川の影響が少なく、NV の汚染程度が低いと考えられ水平垂直分布を明確に把握することができなかった。

A. 研究目的

- 1) かきの NV 汚染経路と養殖海域および流入河川水との関連を調査し、環境水とかき汚染の実態を定量的に把握する。
- 2) 同一のかき筏を対象に NV の水平垂直分布調査を実施し、筏内での養殖かきの NV 汚染の分布を把握する。

平成 13 年 6 月以降検査依頼のあった流通品の生食用かき 14 検体を検査対象とした。流通品の養殖海域は県内の S, I, M, SD, ON であった。

平成 14 年度

平成 14 年 5 月から平成 15 年 12 月までの期間に毎月 1 回県内 2 海域（外湾, 内湾）の養殖かき 47 検体（6 月外湾は 2 検体）、養殖海域海水 15 検体（8 月外湾は実施せず）および同海域流入 2 河川水（内湾 A 河川, 外湾 B 河川, なお 5 月は実施せず）14 検体を検査対象とした。また、外湾海域の筏の養殖ロープを東から西に向かって a, b, c とし、それぞれ表層（水深 0.5m）、中層（7 m）、下層（15m）に垂下してある養殖かきそれぞれ 3 個体合計 27 個体を対象に水平垂直分布調査を実施した。

B. 研究材料と方法

1. 研究材料

平成 13 年度

平成 12 年 10 月から平成 13 年 3 月までの期間に毎月 1 回県内 2 海域（I, U 海域）で採取した養殖かき 12 検体（-80℃で保存）および平成 13 年 10 月から平成 14 年 2 月までの期間に毎月 1 回県内の 1 海域（I 海域）で採取した養殖かき 5 検体、さらに

平成 15 年度

平成 14 年度と同じ 2 海域の養殖かきを対象に、平成 15 年 4 月から平成 16 年 1 月までの 10 ヶ月間、毎月 1 回検体を採取し 20 検体 (60 個体) を対象とした。併せて、この 2 海域に流入している 3 河川 (内湾 A 河川、外湾 B,C 河川) 30 検体についても検査を実施した。A 河川および B 河川は平成 14 年度と同一河川で C 河川については新たに追加して調査を行った。

また、平成 16 年 2 月に平成 14 年度に行った同じ条件下で水平垂直分布調査を実施した。同時に 2 養殖海域の海水を採取し検査を実施した。

2. 研究方法

1) かきからのウイルスの濃縮

平成 14 年度は、かき中腸腺 5 個を 1 検体とし凍結融解法でウイルスの濃縮を行った。他の年度は、かき中腸腺 1 個を 1 検体とし公定法である超遠心法でウイルスの濃縮を行った。

2) 河川水および海水からのウイルス濃縮

平成 14 年度の河川水 6 月分および海水 5、6 月分についてのみ 1L をポリエチレングリコール法 (PEG 法) で濃縮を行った以外の検体は海水 10L、河川水 5L を片山らが開発した陰電化膜法により処理してウイルスの濃縮を行った。平成 15 年度は河川水 1L を対象に PEG 法によりウイルスを濃縮した。

3) ウイルス RNA の抽出

平成 14 年度の河川水 6 月分および海水 5、6 月分についてのみガラスパウダー法でウイルス RNA の抽出を行った以外は、QIAGEN Viral RNA Mini Kit により RNA を抽出した。

4) RT-PCR 法および定量 PCR 法

平成 13 年度はウイルス性下痢症診断マニュアル (第 2 版) に準拠し RT-PCR 法を実施した。

平成 14 年度および 15 年度は平成 13 年 11 月 16 日付け食監発第 267 号厚生労働省医薬局食品保健部監視安全課長通知に従って RT-PCR 法を実施した。定量 PCR 法は Kageyama らの方法 (Journal of Clinical Microbiology, Apr. 2003, p. 1548-1557) に準拠した。

5) 遺伝子解析

増幅産物が確認された検体についてダイレクトシーケンスを行い塩基配列の決定を行った。一方、ダイレクトシーケンスで塩基配列が決定できなかった検体は増幅産物をクローニングし決定した。決定された塩基配列は BLAST reserch で類似配列の検索を行い NV 遺伝子の一部であることを確認後、CLUSTALW で alignment し NJ 法にて系統樹を作成した。

C. 研究成績および考察

平成 12 年度から平成 14 年度の 10 月から 3 月の期間にかきを対象に行った RT-PCR 法による NV の検出検査結果を表-1 に示す。平成 13、14 年度の 3 月は検査を実施しなかったが 1 から 3 月の検出率が著しく高くなる傾向が認められた。A 地区の一医療機関から報告された過去 3 カ年の感染性胃腸炎患者数を図-1 に示す。この地区では各年、胃腸炎患者数は第 50 から 51 週をピークとして、第 10 週までの間は大きな増減がなく推移し、その後報告数は減少する傾向が確認されている。このように胃腸炎患者が最も多くなる時期とかきからの NV 検出率が高くなる時期とはほぼ一致し

ており両者の間には密接な関係があることが強く示唆された。なお、平成15年はすべて定量PCR法で検査を実施したが4月から

翌年1月までの期間にNV陽性検体は確認されなかった。

表-1. RT-PCR法によるかきからの月別NV検出状況

年度 月	平成12		平成13		平成14		合計	
	陽性数/検体数	検出率(%)	陽性数/検体数	検出率(%)	陽性数/検体数	検出率(%)	陽性数/検体数	検出率(%)
10	0/2	0	0/1	0	2/6	33.3	2/9	22.2
11	0/2	0	0/1	0	0/6	0	0/9	0
12	0/2	0	0/1	0	0/6	0	0/9	0
1	2/2	100	2/5	40.0	NT	—	4/7	57.1
2	2/2	100	4/10	40.0	NT	—	6/12	50.0
3	2/2	100	NT	—	NT	—	2/2	100

NT:検査せず

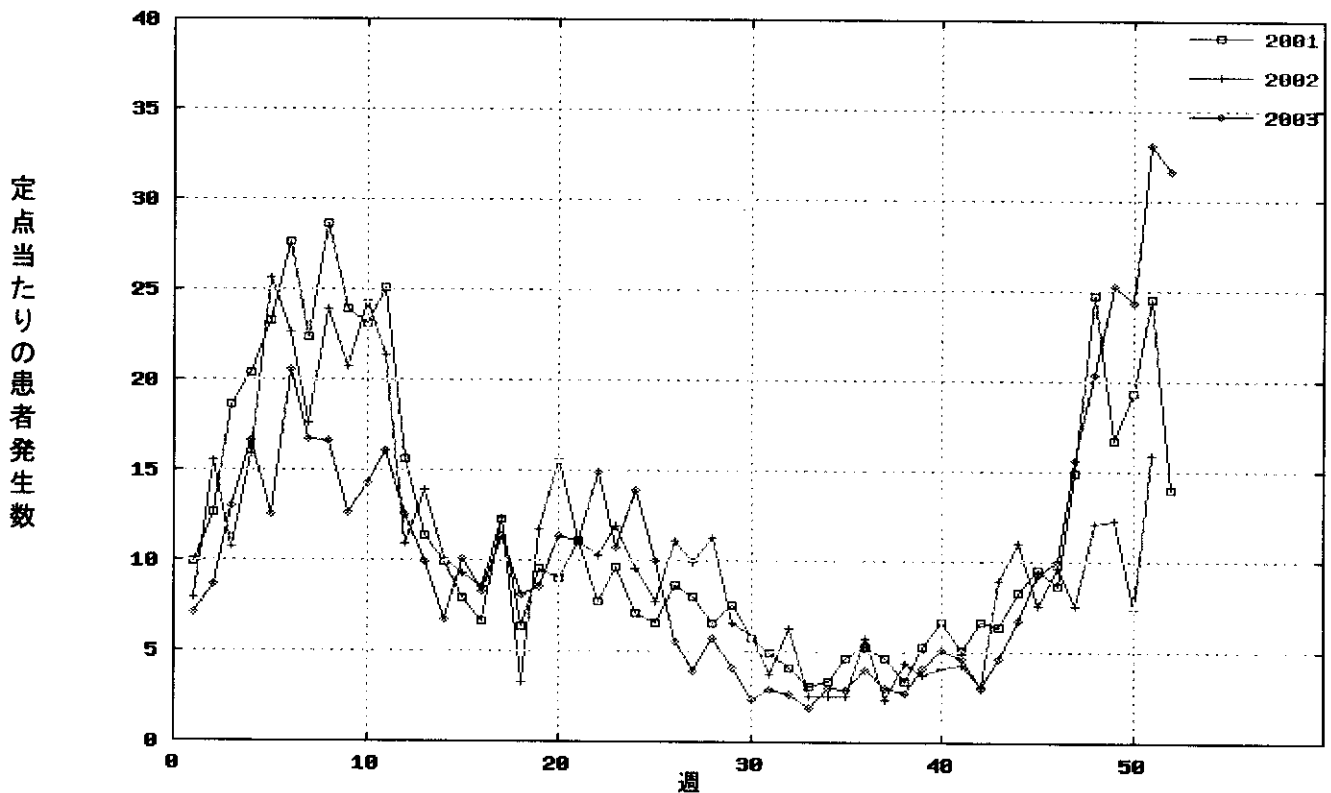


図-1 A地区の都市別感染性胃腸炎患者発生動向

かき養殖海域流入河川および養殖海域海水からのNV検出状況

平成14年度は外湾に流入する1河川、内

湾に流入する1河川および内湾、外湾の海水からのNV検出を行った。その結果、期間中海水からは検出されなかったが内湾に